

REC'D 14 JAN 2005

WIPO

PCT



IB/2004/04128

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2003 A 002498 ✓**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

05 GEN. 2005

Roma, li.....

IL FUNZIONARIO

..... *Giampietro Carlotto*

Giampietro Carlotto

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

MI 2003 A 0 0 2 4 9 8 ✓

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

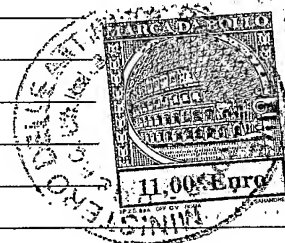


A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	ORESTE, Pasqua Anna		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PF	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 RST PQN 55H47 E514B
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Via Mac Mahon, 43 - 20155 Milano MI		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	ZOPPETTI, Giorgio		
NATURA GIURIDICA (PF/PG)	A2	PF	COD. FISCALE PARTITA IVA	A3 ZPP GRG 56R23 F963G
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Via Mac Mahon, 43 - 20155 Milano MI		
A. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0	R	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)	
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1			
INDIRIZZO	B2			
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	B3			
C. TITOLO	C1	Polisaccaridi antitrombotici a basso peso molecolare e procedimento per la loro preparazione		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	ORESTE, Pasqua Anna
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	ZOPPETTI, Giorgio
NAZIONALITÀ	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITÀ	D2	



SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

E. CLASSE PROPOSTA

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI

FIRMA DEL/DEI	
RICHIEDENTE/I	

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI (DPR 20.10.1998 N. 403).

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME;	I1	Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM) ed altri
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	MARIETTI, GISLON e TRUPIANO S.r.l.
INDIRIZZO	I3	Via Larga, 16
CAP/LOCALITÀ/PROVINCIA	I4	20122 Milano MI
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	Si allega una dichiarazione sostitutiva

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N. ES. ALL.	N. ES. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	1		57
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)	1		03
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITÀ CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	SI		
PROCURA GENERALE			
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE			
	(LIRE/EURO)	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE	
ATTESTATI DI VERSAMENTO	EURO	Quattrocentosettantadue/56	
Foglio AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)	A	D	F
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO? (SI/NO)	SI		
	NO		
DATA DI COMPILAZIONE	17/12/2003		
FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I	Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)		

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	MI 2003 A 0 0 2 4 9 8		
C.C.I.A.A. DI	MILANO	COD.	15
IN DATA	17 DIC. 2003	IL/ I RICHIEDENTE/ I SOPRAINDICATO/ I HA/ HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
LA PRESENTE DOMANDA CORREDATA DI N.	00	FOGLI AGGIUNTIVI PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	L'UFFICIALE ROGANTE		
Francesco Quilicchi	CORTONESI MAURIZIO		



PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA

MI 2003 A 0 0 2 4 9 8

DATA DI DEPOSITO:

107 DIC. 2003

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO

ORESTE, Pasqua Anna
Via Mac Mahon, 43 - 20155 Milano MI
ZOPPETTI, Giorgio
Via Mac Mahon, 43 - 20155 Milano MI

C. TITOLO

Polisaccaridi antitrombotici a basso peso molecolare e procedimento per la loro preparazione

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

Si descrivono nuovi LMWepiK5-N,O-solfati-depolimerizzati ottenibili a partire da un LMW-epiK5-N-solfato preparato per depolimerizzazione nitrosa di un epiK5-N-solfato oppure per C5-epimerizzazione di un LMW-K5-N-solfato ottenuto per depolimerizzazione nitrosa di un K5-N-solfato. Un procedimento consiste nel sottoporre il LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato di partenza a quattro passaggi, una O-supersolfatazione, una O-desolfatazione parziale, una 6-O-solfatazione e una N-solfatazione. I nuovi LMWepiK5-N,O-solfati-depolimerizzati presentano un'unità 2,5-anidromannitolo di- o trisolfatata all'estremità riducente della maggior parte delle catene che li compongono, hanno un contenuto in acido iduronico del 40-60%, un grado di solfatazione di 2,3-2,9 e un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000. Essi sono dotati di una buona attività antitrombotica con basso rischio pro-emorragico.

P. DISEGNO PRINCIPALE

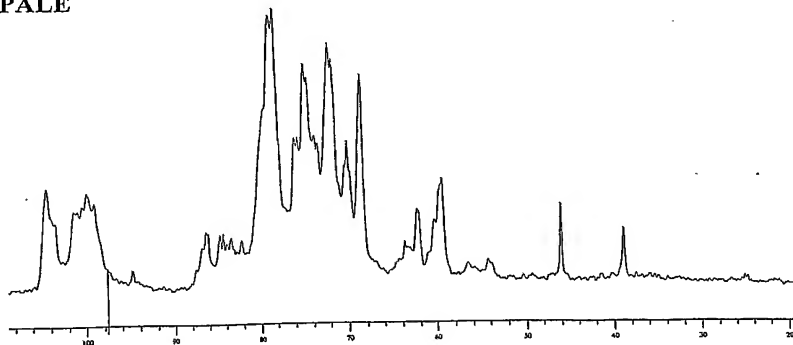
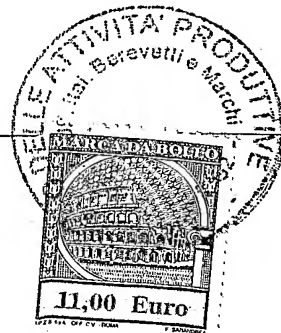


Figura 3

Prodotto finale

FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)



Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)



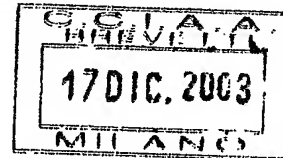
Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Polisaccaridi antitrombotici a basso peso molecolare e procedimento per la loro preparazione"

Titolari: **ORESTE, Pasqua Anna e ZOPPETTI, Giorgio**

entrambi residenti in 20155 Milano MI

Inventori: **ORESTE, Pasqua Anna e ZOPPETTI, Giorgio**



OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione concerne nuovi polisaccaridi a basso peso molecolare derivati dal polisaccaride K5, aventi buona attività sui parametri della coagulazione con scarso rischio emorragico, utili come medicinali per il controllo della coagulazione e per la prevenzione e il trattamento della trombosi. Più particolarmente, l'invenzione si riferisce a nuovi LMW-epiK5-N,O-solfati aventi un grado di solfatazione di 2,7-2,9, ottenibili trattando nuovi LMW-epiK5-N-solfati (a loro volta preparati per depolimerizzazione nitrosa di epiK5-N-solfati), con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione, sottoponendo il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato così ottenuto ad una O-desolfatazione selettiva, trattando il prodotto parzialmente O-desolfatato così ottenuto a una 6-O-solfatazione e infine trattando il prodotto 6-O-risolfatato così ottenuto con un agente solfante nelle condizioni di N-solfatazione. L'invenzione si riferisce inoltre al procedimento per la preparazione dei suddetti LMW-epiK5-N,O-solfati aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e a nuovi intermedi.

CONTESTO DELL'INVENZIONE

I glicosaminoglicani come eparina, eparan solfato, dermatan solfato, condroitin solfato e acido ialuronico sono biopolimeri estratti industrialmente da vari organi animali.

MI 2003 A 0 0 2 4 9 8

In particolare, l'eparina, principalmente ottenuta mediante estrazione da mucosa intestinale di maiale o da polmone bovino, è un copolimero polidisperso con una distribuzione di peso molecolare da circa 3.000 a circa 30.000 D formato da una miscela di catene essenzialmente costituite da un acido uronico (acido glucuronico o acido iduronico) e da un aminozucchero (glucosamina) uniti da legami α -1 \rightarrow 4 o β -1 \rightarrow 4. Nell'eparina, l'unità uronica può essere O-solfatata in posizione 2 e l'unità glucosaminica è N-acetilata o N-solfatata, 6-O-solfatata, e 3-O-solfatata in circa lo 0,5% delle unità glucosaminiche presenti.

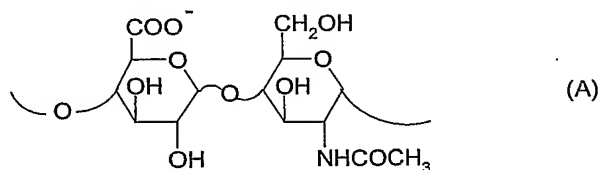
Le proprietà e la naturale biosintesi dell'eparina nei mammiferi sono state descritte da Lindahl e al., 1986 in Lane, D. e Lindahl, U. (Editori) "Heparin. Chemical and Biological Properties; Clinical Applications", Edward Arnold, London, Pagine 159-190, da Lindahl, U, Feingold D. S. e Rodén L, 1986 TIBS, 11, 221-225 e da Conrad H. E. "Heparin Binding Proteins", Capitolo 2: Structure of Heparinoids. Academic Press, 1998. La biosintesi dell'eparina avviene a partire dal suo precursore N-acetil-eparosano costituito da una miscela di catene formate dall'unità disaccaridica ripetitiva glucoronil- β -1 \rightarrow 4-N-acetilglucosamina. Detto precursore subisce modificazioni enzimatiche che idrolizzano parzialmente il gruppo N-acetile, sostituendolo con un gruppo SO_3^- , epimerizzano il carbossile in posizione 5 di una parte delle unità glucuroniche trasformandole in unità iduroniche e introducendo gruppi O-solfati per arrivare a un prodotto che, una volta estratto industrialmente, ha un numero di gruppi solfati circa doppio del numero di carbossili per unità disaccaridica. Queste modificazioni enzimatiche conducono, fra l'altro, alla formazione della regione pentasaccaridica di legame all'antitrombina III (ATIII), chiamata pentasaccaride attivo, che è la struttura necessaria per l'elevato legame di affinità dell'eparina all'ATIII e fondamentale per l'attività anticoagulante e antitrombotica dell'eparina stessa. Questo pentasaccaride,

presente all'interno di solo alcune delle catene che formano l'eparina, contiene un'unità glucosaminica solfatata in posizione 3 e un acido glucuronico intervallato tra disaccaridi contenenti acidi iduronici.


In natura, la formazione del pentasaccaride attivo è resa possibile dalla mancata reazione di epimerizzazione del carbossile di una parte delle unità glucuroniche in unità iduroniche ad opera della D-glucoronil C5-epimerasi (C5-epimerizzazione) e da un'opportuna solfatazione che porta anche all'introduzione di un gruppo solfato sull'ossidrilico in posizione 3 della glucosamina. Più particolarmente, in natura la formazione del pentasaccaride attivo è resa possibile dal fatto che la C5-epimerizzazione avviene a grappolo ("cluster" in inglese), vale a dire su porzioni di catene, e in modo estensivo che conduce a un prodotto che contiene più unità iduroniche che glucuroniche. L'eparina commerciale contiene infatti circa il 70% di unità iduroniche e il 30% di unità glucuroniche.

STATO DELLA TECNICA

E' noto che il polisaccaride capsulare K5 isolato da *Escherichia coli*, descritto da Vann W. F. et al., in European Journal of Biochemistry, 1981, 116, 359-364 ("Vann 1981"), è costituito da una miscela di catene formate dall'unità disaccaridica ripetitiva glucoronil- β -1 \rightarrow 4-N-acetil glucosamina e mostra dunque la stessa unità disaccaridica ripetitiva (A)



dell'N-acetil-eparosano precursore dell'eparina. Il polisaccaride capsulare K5, indicato qui di seguito "polisaccaride K5" o più semplicemente "K5", è stato modificato per via chimica da Lormeau et al. come descritto in US 5,550,116 e da Casu et al. come



descritto in Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284. K5-O-solfati aventi attività antitumorale, antimetastatica, antivirale, in particolare anti-HIV, sono descritti in EP 333243 e WO 98/34958. Il K5 è stato anche modificato per via chimica e enzimatica al fine di ottenere prodotti aventi un'attività biologica in vitro sulla coagulazione dello stesso tipo di quella dell'eparina così come estratta da organi animali (eparina estrattiva).

L'ottenimento dei prodotti aventi un'attività sulla coagulazione dello stesso tipo di quella dell'eparina estrattiva avviene mediante procedimenti che mimano quello che avviene in natura e prevedono tutti il passaggio chiave di C5-epimerizzazione con D-glucuronil C5 epimerasi.

I procedimenti descritti in IT 1230785, WO 92/17507, WO 96/14425 e WO 97/43317 utilizzano il K5 come materiale di partenza. Il K5 proveniente da fermentazione è sottoposto a una N-deacetilazione seguita da N-solfatazione e sul K5-N-solfato così ottenuto è effettuata una C5-epimerizzazione con C5-epimerasi in soluzione, ottenuta o per cromatografia di una soluzione di enzimi microsomiali da mastocitoma di topo (IT 1230 785) oppure da fegato bovino (WO 92/17507, WO 96/14425 e WO 97/43317).

La D-glucuronil C5 epimerasi da fegato bovino è stata purificata da Campbell, P. et al. in J. Biol. Chem., 1994, 269/43, 26953-26958 ("Campbell 1994") che hanno anche fornito la sua composizione in aminoacidi e descritto il suo uso in soluzione per la trasformazione di un K5-N-solfato nel corrispondente prodotto epimerizzato al 30%, dimostrando la formazione di acido iduronico mediante metodo HPLC seguente ad una depolimerizzazione nitrosa totale fino a disaccaride.

Il documento WO 98/48006 descrive la sequenza del DNA che codifica la D-glucuronil C5 epimerasi e una D-glucuronil C5 epimerasi ricombinante, ottenuta da un



vettore di espressione ricombinante contenente detto DNA, successivamente purificata da Campbell et al. come illustrato da Jin-Ping L. et al. in J. Biol Chem. 2001, 276, 20069-20077 ("Jin-Ping 2001").

La sequenza completa della C5-epimerasi è stata descritta da Crawford B. E. et al. in J. Biol. Chem., 2001, 276(24), 21538-21543 (Crawford 2001).

Il documento WO 01/72848 descrive un metodo per la preparazione di derivati N-deacetilati N-solfati del polisaccaride K5, epimerizzati almeno al 40% di acido iduronico rispetto al totale degli acidi uronici, aventi un peso molecolare da 2.000 a 30.000, contenenti dal 25 al 50% di catene ad alta affinità per l'ATIII e aventi un'attività anticoagulante e antitrombotica espressa come rapporto HCII/antiXa da 1,5 a 4.

Detto procedimento, che comprende in sequenza la preparazione del K5 da *Escherichia coli*, N-deacetilazione e N-solfatazione, C5 epimerizzazione, supersolfatazione, selettiva O-desolfatazione, 6-O-solfatazione e N-solfatazione, prevede che la C5 epimerizzazione sia condotta con C5 epimerasi, in soluzione o immobilizzata, in presenza di cationi bivalenti specifici. Secondo il documento WO 01/72848, la C5 epimerizzazione può essere condotta indifferentemente con un enzima naturale o ricombinante, immobilizzato o in soluzione, a una temperatura da 30 a 40°C per un periodo di tempo da 1 a 24 ore.

Inoltre, detto documento descrive una reazione di depolimerizzazione con acido nitroso eseguita sul prodotto ottenuto al termine della sequenza di reazioni sopra menzionata.

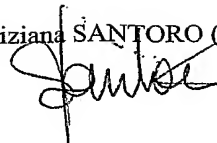
Il documento US 2002/0062019 descrive un procedimento per la preparazione di epiK5-N,O-solfati, attivi sul controllo della coagulazione, aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e un peso molecolare da 2.000 a 30.000, oppure da 4.000 a

8.000, oppure da 18.000 a 30.000. Il suddetto procedimento comporta i passaggi: (p-a) una N-deacetilazione del polisaccaride K5 e una N-solfatazione della K5-amina risultante, (p-b) un'epimerizzazione del K5-N-solfato, (p-c) una O-supersolfatazione dell'epiK5-N-solfato, (p-d) una O-desolfatazione parziale, (p-e) una 6-O-solfatazione selettiva, (p-f) una N-solfatazione del prodotto così ottenuto, qualsiasi prodotto ottenuto al termine di uno dei passaggi (p-b)-(p-f) potendo essere sottoposto a depolimerizzazione. Detto documento descrive un epiK5-N,O-solfato avente un peso molecolare di 7.400, ottenuto mediante i passaggi (p-a)-(p-f) suddetti seguiti da una depolimerizzazione nitrosa alla fine del passaggio (p-f), a grado di solfatazione da 2,3 a 2,9.

Lo stesso documento descrive inoltre una frazione di K5 a peso molecolare di circa 5.000 che può anch'essa essere sottoposta ai passaggi (p-a) – (p-f).

Al fine di uniformare la terminologia e rendere il testo più comprensibile, nella presente descrizione si useranno termini o espressioni convenzionali, al singolare o al plurale. In particolare:

- con "K5" o "polisaccaride K5" si intende il polisaccaride capsulare da *Escherichia coli* ottenuto per fermentazione, vale a dire una miscela di catene costituite da unità disaccaridiche (A) eventualmente contenenti un doppio legame all'estremità non riducente come sopra illustrato, comunque preparato e purificato secondo i metodi descritti in letteratura, in particolare secondo Vann 1981, secondo Manzoni M. et al., Journal of Bioactive Compatible Polymers, 1996, 11, 301-311 ("Manzoni 1996") o secondo il metodo descritto in WO 01/72848 o in US 2002/0062019; è ovvio per un esperto del mestiere che quanto illustrato qui di seguito si applica a qualunque N-acetileparosano;
- con "C5-epimerasi" si intende la D-glucuronil C-5 epimerasi, estrattiva o



ricombinante, comunque preparata, isolata e purificata, in particolare come descritto in Campbell 1994, in WO 98/48006, in Jin-Ping L. et al. in J. Biol Chem. 2001, 276, 20069-20077 (Jin-Ping 2001") o in Crawford 2001;

- con K5-amina si intende il K5 N-deacetilato per almeno il 95%, preferibilmente completamente N-deacetilato, vale a dire in cui gruppi N-acetile non sono rilevabili con un normale apparecchio NMR;
- con "K5-N-solfato" si intende il K5 N-deacetilato e N-solfato per almeno il 95%, preferibilmente al 100% in quanto gruppi N-acetile non sono rilevabili con un normale apparecchio NMR;
- con "epiK5" si intende il K5 e i suoi derivati in cui il 40-60% delle unità glucuroniche è C5-epimerizzato a unità iduroniche;
- con "epiK5-N-solfato" si intende il K5-N-solfato in cui il 40-60% delle unità glucuroniche è C5-epimerizzato a unità iduroniche;
- con "epiK5-amina-O-supersolfato" si intende un epiK5-amina-O-solfato con un grado di solfatazione di almeno 2;
- con "epiK5-N,O-solfato" si intende un K5-N,O-solfato in cui il 40-60% delle unità glucuroniche è C5-epimerizzato a unità iduroniche, con un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9.
- i termini e espressioni convenzionali qui sopra definiti si riferiscono a K5 così come isolati dopo fermentazione, generalmente con una distribuzione di pesi molecolari da circa 1.500 a circa 50.000 con un peso molecolare medio di 12.000- 25.000, vantaggiosamente di 15.000-25.000;
- salvo specifica indicazione del peso molecolare, i termini e espressioni convenzionali qui sopra definiti, quando preceduti dall'acronimo "LMW" (dall'inglese "low molecular weight", basso peso molecolare), in particolare

LMW-epiK5-N-solfato, LMW-epiK5-amina-O-supersolfato, LMW-K5-N,O-solfato, designano prodotti a basso peso molecolare, aventi un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000;

- i termini e espressioni convenzionali come qui sopra definiti, quando sono seguiti da “-derivato” designano globalmente tanto i derivati da K5 nativo che quelli a basso peso molecolare;
- il termine “LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato”, designa un LMW-epiK5-N-solfato ottenuto secondo la sequenza (i)→(ii) o la sequenza (ii)→(i) come illustrato qui di seguito; analogamente, i termini LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato e LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato designano un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato e, rispettivamente, un LMW-epiK5-N,O-solfato ottenuti a partire da un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato;
- il prefisso “(epi)”, che precede “K5” nei termini e espressioni convenzionali come qui sopra definiti, designa globalmente tanto i prodotti da K5 nativo che quelli da epiK5 (epimerizzati per il 40-60%) come sopra definiti,

Inoltre:

- salvo diversa, specifica indicazione, con il termine “peso molecolare” o “peso molecolare medio” si intende il peso molecolare determinato tramite HPLC contro standard di eparina e di eparina a basso peso molecolare;
- con il termine “circa” riferito al peso molecolare si intende il peso molecolare misurato per viscosimetria \pm il peso teorico di un'unità disaccaridica, inclusiva del peso del sodio, calcolata 461 nel caso di un epiK5-N-solfato-derivato e 644 nel caso di un epiK5-N,O-solfato-derivato con grado di solfatazione di 2,8;





- con l'espressione "specie preponderante", si intende il composto che, nella miscela costituente il LMW-epiK5-N-solfato, il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato o il LMW-epiK5-N,O-solfato, è la specie più rappresentata, determinata dal picco della curva del peso molecolare misurato mediante HPLC;
- salvo specifica, diversa indicazione, con "grado di solfatazione" si intende il rapporto $\text{SO}_3^-/\text{COO}^-$, esprimibile anche come numero di gruppi solfato per unità disaccaridica, misurato con il metodo conduttimetrico descritto da Casu B. et al. in Carbohydrate Research, 1975, 39, 168-176 (Casu 1975);
- con "condizioni di O-supersolfatazione" si intende una O-solfatazione spinta effettuata per esempio secondo il "Metodo C" descritto da B. Casu et al. in Carbohydrate Research, 1994, 263, 271-284 (Casu 1994);
- con il termine "alchile" si intende un alchile lineare o ramificato, mentre con "tetrabutylammonio" si intende indicare il gruppo tetra-(n-butyl)ammonio.

Infine, si deve notare che, in letteratura, il polisaccaride K5 (K5) viene anche chiamato "acetilaminoeparosano", per cui K5-amina corrisponde a "aminoeparosano", K5-N-solfato corrisponde a "sulfaminoeparosano" e così via, mentre quando questi prodotti sono epimerizzati, in letteratura i termini suddetti sono fatti seguire (o, in inglese, precedere) dal termine "epimerizzato". In questo contesto, la presente descrizione si riferisce a "K5" al fine di mettere in evidenza l'origine dei prodotti qui descritti.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Nella domanda di brevetto PCT/IB03/02338, incorporata alla presente descrizione per riferimento, vengono descritti nuovi epiK5-amina-O-supersolfati-derivati utili come intermedi nella preparazione di epiK5-N,O-supersolfato-derivati

dotati di attività antiangiogenetica e antivirale. Detti epiK5-amina-O-supersolfati-derivati vengono preparati mediante un procedimento che comprende il trattare un epiK5-N-solfato-derivato con, preferibilmente, idrossido di tetrabutylammonio, lasciando la miscela di reazione a sé per un periodo di tempo di circa 30-60 minuti a pH di circa 7 e isolare il sale preferibilmente di tetrabutylammonio così ottenuto; e il trattare detto sale con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione. Il suddetto documento descrive la preparazione di LMW-epiK5-amina-O-supersolfati a partire da un LMW-epiK5-N-solfato.

Lo stesso documento PCT/IB03/02338, nonché i documenti IT MI2002A001346 e IT MI2002A001854 pure incorporati nella presente descrizione come riferimento, descrivono per la prima volta LMW-epiK5-N-solfati, preferibilmente privi di gruppi N-acetile, in cui il contenuto di acido iduronico rispetto al totale di acidi uronici è del 40-60%, preferibilmente intorno al 50%, che costituiscono nuovi validi intermedi per la preparazione di LMW-epiK5-N,O solfati aventi un elevato grado di attività su diversi parametri biologici, in particolare su parametri della coagulazione (IT MI2002A001346). La preparazione di detti LMW-epiK5-N-solfati è descritta in dettaglio nei tre documenti suddetti.

Inoltre, PCT/IB03/02339 descrive composizioni farmaceutiche, contenenti, come un loro principio attivo un (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato o un suo sale farmaceuticamente accettabile, ottenibile mediante un procedimento caratterizzato dal fatto che

- si tratta un (epi)K5-N-solfato-derivato, in forma acida, con una base organica terziaria o quaternaria, lasciando la miscela di reazione a sé per un periodo di tempo di 30-60 minuti, mantenendo il pH della soluzione a un valore di circa 7 mediante aggiunta di detta base organica terziaria o quaternaria e si isola il suo

sale con detta base organica;

- si tratta detto sale di base organica di detto (epi)K5-N-solfato-derivato con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione e si isola l'(epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato.

Nel preparare derivati N-deacetilati N,O-solfati del polisaccaride K5, epimerizzati almeno al 40% di acido iduronico rispetto al totale degli acidi uronici e aventi basso peso molecolare come descritto in WO 01/72848 e in US 2002/0062019, è stato constatato che la depolimerizzazione del prodotto ad alto peso molecolare ottenuto alla fine del passaggio (g) del procedimento descritto in WO 01/72848 e alla fine del passaggio (vi) del procedimento descritto in US 2002/0062019 può dare risultati non uniformi in quanto si ottengono in generale dei prodotti depolimerizzati aventi un'attività su tutti i parametri della coagulazione molto inferiore a quella dei prodotti ad alto peso molecolare da cui derivano. Questo avviene perché la degradazione con acido nitroso viene influenzata dalla presenza dei gruppi solfati. In particolare i solfati in posizione 3 della glucosamina portano a prodotti disomogenei, come descritto da Nagasawa et al. in Thrombosis Research, 1992, 65, 463-467 (Nagasawa 1992). In US 2002/0062019, l'inconveniente è stato superato effettuando il passaggio di O-desolfatazione selettiva mantenendo il tempo di reazione del prodotto supersolfatato con dimetilsolfossido/metanolo nell'ambito di 135-165 minuti, preferibilmente a circa 60°C per 150 minuti. Questo particolare, vantaggioso modo di procedere è descritto in dettaglio in WO 02/50125.

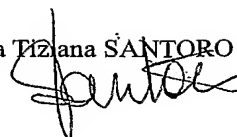
E' stato ora trovato che LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati aventi un grado di solfatazione da circa 2,3 a 2,9 e una buona attività sui parametri della coagulazione possono essere preparati sottoponendo un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato a una reazione di O-supersolfatazione, per esempio secondo il Metodo

C descritto da B. Casu et al. In Carbohydrate Research, 1975, 39, 168-176 (Casu 1975) per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato, sottoponendo il prodotto supersolfatato-depolimerizzato a una O-desolfatazione selettiva e infine trattando il prodotto parzialmente desolfatato-depolimerizzato così ottenuto con un agente solfatante nelle condizioni di N-solfatazione per isolare il desiderato LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato avente un grado di solfatazione da circa 2,3 a circa 2,9.

E' stato inoltre trovato che, operando a partire da un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato, la reazione di O-desolfatazione selettiva con dimetilsolfossido/metanolo può essere effettuata in un più vasto ambito di tempi di riscaldamento, ottenendo così LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati finali in modo riproducibile con attività sui parametri della coagulazione sempre elevata, anche se variabile in funzione dei tempi di O-desolfatazione selettiva impiegati.

In particolare, è stato sorprendentemente trovato che, se si sottopone un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato avente un peso molecolare medio di circa 6.000 a O-supersolfatazione, il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato così ottenuto a una O-desolfatazione selettiva e il prodotto parzialmente O-desolfatato-depolimerizzato così ottenuto a 6-O-solfatazione e poi a N-solfatazione, operando in condizioni simili a quelle descritte in WO 02/50125, si ottiene un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato avente un peso molecolare medio di circa 6.000, un grado di solfatazione di 2,7-2,9, un'attività anti-Xa e un'attività anti-IIa ambedue circa la metà dello Standard Internazionale di eparina a basso peso molecolare (sLMWH, in inglese "standard Low Molecular Weight Heparin"), vale a dire un rapporto anti-Xa/anti-IIa identico a quello della sLMWH, ma una capacità di aumentare il tempo di coagulazione da 5 a 8 volte inferiore a quello della sLMWH. Si è così ottenuto per la prima volta un glicosaminoglicano derivato dal polisaccaride K5 che può essere assimilato alla





sLMWH per quanto riguarda il rapporto tra le attività anti-Xa e antitrombina e che, a parità di dosaggio, presenta un rischio emorragico da 2,5 a 4 volte inferiore.

Inoltre, è stato trovato che tutti i LMW-epiK5-amina-O-supersolfati-depolimerizzati ottenibili mediante un procedimento che comprende il trattamento di un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione, con un grado di solfatazione da 2 a 4, sono sostanzialmente privi di attività anticoagulante e hanno una buona attività microbica, al pari di quelli descritti in PCT/IB03/02339.

Infine, è stato trovato che tutti gli (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivati ottenuti per trattamento dei corrispondenti (epi)K5-N-solfati con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione, aventi un grado di solfatazione da 2 a 4, sono sostanzialmente privi di attività anticoagulante, hanno una buona attività microbica e sono quindi principi attivi di composizioni farmaceutiche. Dette composizioni farmaceutiche sono destinate al trattamento di infezioni di origine microbica, in particolare virale.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La Figura 1 mostra lo spettro ^{13}C -NMR del LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato dell'esempio 1.

La Figura 2 mostra lo spettro ^{13}C -NMR del LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno l'80% di 6-O-solfato dell'esempio 1.

La Figura 3 mostra lo spettro ^{13}C -NMR del LMW-epiK5-amina-N,O-solfato depolimerizzato finale dell'esempio 1 indicante la presenza di unità di 2,5-anidromannitolo solfatate.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Così, secondo uno dei suoi aspetti, la presente invenzione si riferisce a un

procedimento per la preparazione di nuovi LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati a grado di solfatazione da 2,3 a 2,9, e dei loro sali farmaceuticamente accettabili, caratterizzato dal fatto che

- (a) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria di un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato;
- (b) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato così ottenuto ad una O-desolfatazione selettiva per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato;
- (c) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di O-solfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato;
- (d) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato così ottenuto ad una reazione di N-solfatazione e si isola il LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato così ottenuto, preferibilmente sotto forma del suo sale sodico che, se desiderato, viene convertito in un altro sale farmaceuticamente accettabile.

Sali farmaceuticamente accettabili preferiti sono i sali di metalli alcalini, in particolare di sodio o potassio, i sali di metalli alcalino-terrosi, in particolare di magnesio o di calcio, il sale di alluminio e il sale di zinco.

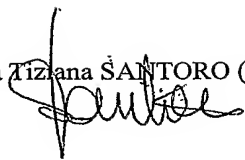
I LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza come sopra illustrati vengono preparati mediante un procedimento caratterizzato dal fatto che si sottopone un K5-N-solfato, in un qualsiasi ordine,

- (i) a una C5-epimerizzazione con una D-glucuronil C5-epimerasi isolata, purificata e in soluzione o immobilizzata su un supporto solido, a un pH di circa 7, a una temperatura di circa 30°C e per un periodo di tempo di 12-24 ore in presenza di almeno uno ione bivalente scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese; e
- (ii) a una depolimerizzazione nitrosa eventualmente seguita da una riduzione, normalmente con boroidruro di sodio.

L'espressione "in qualsiasi ordine" indica che il procedimento può essere indifferentemente condotto sia nel senso (i)-(ii), vale a dire nella sequenza sopra indicata, che in senso inverso, vale a dire anche nel senso (ii)-(i), sottoponendo il K5-N-solfato dapprima alla reazione di depolimerizzazione nitrosa, eventualmente seguita dalla riduzione con boroidruro di sodio, e successivamente alla C5-epimerizzazione nelle condizioni suddette. L'ordine preferito è nel senso (i)→(ii). La sequenza (ii)-(i) viene preferibilmente utilizzata a partire da LMW-K5-N-solfati aventi un peso molecolare medio superiore a 4.000, preferibilmente a partire da circa 6.000. Per esempio, si possono stabilire le quantità di nitrito sodico che, a partire da 1 g di epiK5-N-solfato, permettono di ottenere un LMW-epiK5-N-solfato con un peso molecolare medio superiore a 4.000, in particolare di almeno 6.000, in modo da ottenere utili intermedi per la preparazione di corrispondenti LMWepiK5-N,O-solfati a grado di solfatazione da 2,3 a 2,9. Infatti, in questo caso, nel passaggio (ii) si ottiene la percentuale di epimerizzazione ottimale.

I simboli (i) e (ii), come utilizzati qui di seguito, designano, rispettivamente, il passaggio di depolimerizzazione e il passaggio di C5-epimerizzazione qualunque sia l'ordine in cui questi passaggi vengono effettuati.

La C5-epimerasi può essere usata in soluzione o immobilizzata su supporto



solido inerte. In quest'ultimo caso, la C5-epimerasi, preferibilmente ricombinante, isolata e purificata per esempio secondo Campbell 1994, WO 98/48006, Jin-Ping 2001 o Crawford 2001, viene immobilizzata su un supporto inerte in presenza del substrato, vale a dire in presenza del K5-N-solfato di partenza oppure in presenza del LMW-K5-N-solfato normalmente avente un peso molecolare medio superiore a 4.000, vantaggiosamente da 4.000 a 7.500, più vantaggiosamente da 5.000 a 7.500, preferibilmente di almeno 6.000. L'immobilizzazione viene effettuata secondo i metodi convenzionali, per esempio come descritto in WO 01/72848.

La reazione di C-5 epimerizzazione viene condotta facendo ricircolare 20-1.000 ml di una soluzione di HEPES 25 mM a pH circa 7 contenente 0,001-10 g di substrato (K5-N-solfato o LMW-K5-N-solfato, preferibilmente a peso molecolare medio superiore a 4.000, in particolare da 4.000 a 7.500) e un catione scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese a una concentrazione tra 10 e 60 mM attraverso una colonna contenente da $1,2 \times 10^7$ a 3×10^{11} cpm dell'enzima immobilizzato, mantenendo il pH a circa 7 a circa 30°C, a un flusso di 30-220 ml/ora per un periodo di tempo di 12-24 ore, vantaggiosamente di 15-24 ore.

Preferibilmente si fa ricircolare detta soluzione a un flusso di circa 200 ml/ora per tutta una notte (15-20 ore). Il prodotto ottenuto è purificato e separato secondo metodi noti, per esempio mediante ultrafiltrazione e precipitazione con etanolo. Il prodotto così ottenuto è costituito o da epiK5-N-solfato (e in tal caso viene disciolto in acqua e sottoposto a depolimerizzazione) oppure da LMW-epiK5-N-solfato (in tal caso costituisce il prodotto finale). La percentuale di epimerizzazione, in pratica la quantità di unità iduroniche rispetto alle glucuroniche, è calcolata con ^1H -RMN secondo il metodo descritto in WO 96/4425.

La reazione di depolimerizzazione nitrosa è condotta secondo i metodi noti per



la depolimerizzazione dell'eparina, per esempio secondo il metodo descritto in EP 37319, in WO 82/03627 oppure secondo il metodo per la depolimerizzazione di un K5-N-solfato descritto in EP 544592, ma a partire da un K5-N-solfato o da un epiK5-N-solfato contenente da 0 a non più del 5%, di gruppi acetile. Preferibilmente, la depolimerizzazione, effettuata con nitrito sodico e acido cloridrico su un epiK5-N-solfato, è seguita da una riduzione *in situ* con boroidruro di sodio.

In pratica, una soluzione acquosa fredda dell'(epi)K5-N-solfato viene portata a pH acido (circa 2) con acido cloridrico e, sempre a freddo, trattata con nitrito sodico mantenendo la temperatura (circa 4°C) e il pH (circa 2) costanti e, al termine della depolimerizzazione (circa 15 - 30 minuti) la soluzione viene neutralizzata con idrossido di sodio e trattata, sempre a circa 4°C, con una soluzione acquosa di boroidruro di sodio. Al termine della riduzione (circa 4 ore) l'eccesso di boroidruro di sodio è distrutto con acido cloridrico, la soluzione è neutralizzata con idrossido di sodio e il prodotto depolimerizzato (e ridotto) viene isolato secondo metodi noti, per esempio per semplice precipitazione con etanolo o acetone. Il prodotto ottenuto al termine della depolimerizzazione può essere o un LMW-epiK5-N-solfato (in tal caso costituisce il prodotto finale) oppure un LMW-K5-N-solfato (e in tal caso viene direttamente sottoposto a C5-epimerizzazione come illustrato qui sopra, dopo isolamento), in particolare quando possiede un peso molecolare medio superiore a 4.000, vantaggiosamente da 4.000 a 7.500, più vantaggiosamente da 5.000 a 7.500, preferibilmente di almeno 6.000. Controllando opportunamente la reazione di depolimerizzazione, in particolare utilizzando diverse quantità di nitrito sodico/acido cloridrico, si ottengono LMW-K5-N-solfati o LMW-epiK5-N-solfati aventi un peso molecolare medio in tutto l'intervallo da circa 1.500 a circa 12.000, vantaggiosamente da circa 1.500 a circa 10.000, preferibilmente da circa 1.500 a circa 7.500, calcolato allo



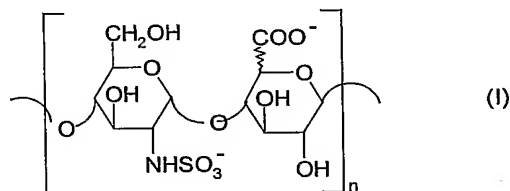
spettro ^{13}C -RMN attraverso l'integrazione del segnale attribuito al C2 del 2,5-anidromannitolo con quella del carbonio anomerico della glucosamina interna alla catena polisaccaridica.

Secondo un modo di procedere generale, partendo ad esempio da 1 g di epiK5-N-solfato, il prodotto di partenza viene disciolto in 100-200 ml di acqua deionizzata e termostatato a 4 °C. Si addiziona quindi un quantitativo di sodio nitrito tale da ottenere il peso molecolare medio desiderato. Per ottenere, per esempio un LMW-(epi)K5-N-solfato con un peso molecolare medio da circa 2.000 a circa 4.000 partendo da un (epi)K5-N-solfato avente un peso molecolare medio di 20.000 (misurato con metodo HPLC equipaggiato con colonna BioRad BioSil 250 e utilizzando standard di eparina a peso molecolare noto), bisognerà addizionare da 330 a 480 mg di sodio nitrito disciolti in una soluzione acquosa allo 0,2 %. La soluzione contenente l'(epi)K5-N-solfato e il sodio nitrito, mantenuta a 4°C, viene portata a pH 2 tramite aggiunta di HCl 0,1 N raffreddato a 4°C. Si lascia reagire sotto lenta agitazione per 20-40 minuti, quindi si neutralizza con NaOH 0,1 N. Il prodotto ottenuto viene portato a temperatura ambiente e trattato con agente riducente come ad esempio sodio boroidruro (250-500 mg disciolti in 50-100 ml di acqua) e lasciato reagire per 4-8 ore. L'eccesso di sodio boroidruro viene eliminato portando il pH a 5-5,5 con HCl 0,1 N e lasciato a sé per altre 2-4 ore. Alla fine si neutralizza con NaOH 0,1 N e si recupera il prodotto tramite precipitazione con acetone o etanolo dopo aver concentrato il prodotto tramite evaporazione a pressione ridotta.

Analogamente, si possono stabilire le quantità di nitrito sodico che, a partire da 1 g di K5-N-solfato o di epiK5-N-solfato, permettono di ottenere un LMW-K5-N-solfato o un LMW-epiK5-N-solfato con un peso molecolare medio da circa 4.000 a circa 12.000, vantaggiosamente da circa 4.000 a circa 7.500, in particolare di 6.000-7.500.

I LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati così ottenuti, con un contenuto in acido iduronico dal 40 al 60%, preferibilmente del 50-55%, preferibilmente praticamente privi di gruppi NH_2 e N-acetile, con un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000, vantaggiosamente da circa 1.500 a circa 10.000, preferibilmente da circa 1.500 a circa 7.500 e i loro sali chimicamente o farmaceuticamente accettabili costituiscono materiali di partenza nella preparazione dei LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati della presente invenzione.

Vantaggiosamente, i materiali di partenza nella preparazione dei LMW-epiK5-N,O-solfati della presente invenzione sono LMW-epiK5-N-solfati costituiti da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I



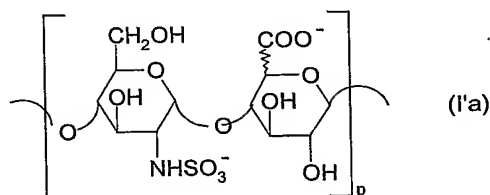
in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60%, preferibilmente per il 50-55%, da acido iduronico, n è un numero intero da 2 a 20, vantaggiosamente da 3 a 15, e il corrispondente catione è chimicamente accettabile.

In questo contesto, il termine "chimicamente" è riferito a un catione utile nelle sintesi chimiche, come gli ioni sodio, ammonio, $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ tetraalchilammonio, o per la purificazione del prodotto.

Cationi vantaggiosi sono quelli derivati da metalli alcalini, metalli alcalino-terrosi, ammonio, tetra $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ alchilammonio, alluminio e zinco. Cationi preferiti sono gli ioni sodio, calcio e tetrabutylammonio.

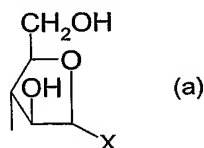
Particolarmente interessanti prodotti di partenza sono i LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati costituiti da una miscela di catene in cui almeno 90% di dette catene ha

la formula I qui sopra, ottenuti mediante depolimerizzazione nitrosa dei corrispondenti epiK5-N-solfati sopra illustrati e successiva riduzione per esempio con boroidruo di sodio. Tra questi, LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati costituiti da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula I'a

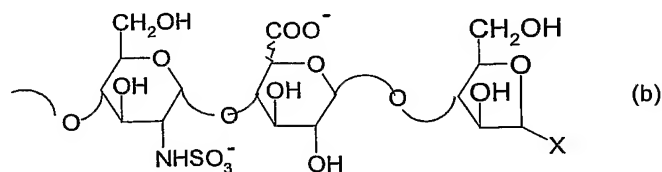


in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, p è un numero intero da 4 a 8, e il catione corrispondente è chimicamente o farmaceuticamente accettabile, sono materiali di partenza particolarmente vantaggiosi. Il peso molecolare medio di questi prodotti è da circa 2.000 a circa 4.000.

La provenienza di questi epiK5-N-solfati da un passaggio di depolimerizzazione nitrosa seguita da riduzione con ad esempio sodio boroidruo comporta, all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, la presenza di un'unità di 2,5-anidromannitolo, di struttura (a)

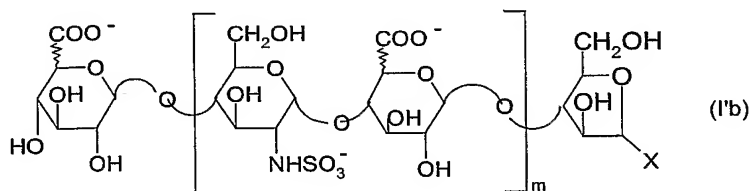


in cui X rappresenta un gruppo idrossimetile. Di conseguenza, l'estremità riducente della maggioranza (60-70% delle catene) è in realtà rappresentata dalla struttura (b)



in cui X è come sopra definito.

Altri LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati particolarmente vantaggiosi come materiali di partenza secondo la presente invenzione sono costituiti da miscele di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula I'b



in cui X è idrossimetile, m è 4, 5 o 6, il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile e le unità glucuroniche e iduroniche sono presenti in modo alternato, l'estremità non riducente essendo glucuronica o iduronica. In tal caso il rapporto glucuronico/iduronico è da 45/55 a 55/45, vale a dire circa 50/50.

L'uso della C5-epimerasi, preferibilmente ricombinante, preferibilmente immobilizzata su supporto solido nelle condizioni sopra illustrate permette pertanto l'epimerizzazione di K5-N-solfato-derivati in epiK5-N-solfato-derivati non a "cluster" come avviene in natura, ma in modo regolare.

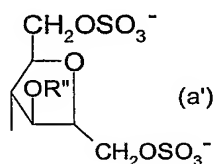
Quando la preparazione del LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato viene effettuata secondo la sequenza (ii)→(i), l'epimerizzazione avviene in modo ottimale se effettuata su un LMW-K5-N-solfato-depolimerizzato avente un peso molecolare medio superiore a 4.000, vantaggiosamente da 5.000 a 7.500, preferibilmente da 6.000 a 7.500.

Gli epiK5-N-solfati utilizzati per la preparazione dei suddetti LMW-epi-K5-N-solfati-depolimerizzati di partenza sono quelli aventi un contenuto in acido iduronico del 40-60% e contengono almeno 95% di gruppi N-solfato, come per esempio quelli descritti in WO 01/72848, in US 2002/0062019 o in WO 02/068477.

Nella preparazione dei nuovi LMW-epi-K5-N,O-solfati-depolimerizzati secondo

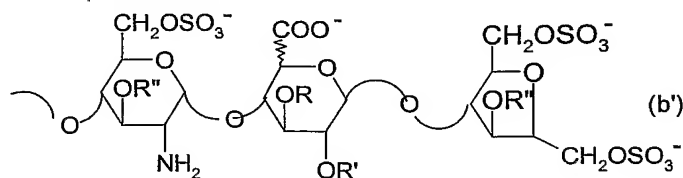
il processo (a)-(d) sopra illustrato, il passaggio (a) consiste in una O-supersolfatazione dei LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza che può essere effettuata secondo uno dei metodi descritti in letteratura, per esempio secondo il Metodo C descritto da Casu et al., o con varianti dello stesso metodo ad esempio come descritto in US 2002/0062019, al fine di ottenere un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato.

La provenienza dei LMW-epiK5-amina-O-supersolfati-depolimerizzati da LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati ottenuti per depolimerizzazione nitrosa e successiva riduzione con, ad esempio, boroidruro di sodio, comporta all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, la presenza di un'unità 2,5-anidromannitolo solfatata di struttura (a')



in cui R'' rappresenta idrogeno o SO_3^- .

Così, l'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene è rappresentata dalla struttura (b')



in cui l'unità uronica può essere glucuronica o iduronica.

Operando come descritto in US 2002/62019, una soluzione contenente il LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato a concentrazione del 10% viene raffreddata a 10°C e quindi passata attraverso resina a scambio cationico IR-120 H^+ o equivalente (35-100

ml). Sia la colonna che il contenitore dell'eluato sono mantenuti a 10°C. Dopo il passaggio della soluzione la resina viene lavata con acqua deionizzata fino a che il pH del permeato è maggiore di 6 (circa 3 volumi di acqua deionizzata). La soluzione acida viene portata a neutralità con una ammina terziaria o quaternaria come ad esempio il tetrabutylammonio idrossido (soluzione acquosa al 15%) ottenendo il relativo sale di ammonio. La soluzione viene concentrata a volume minimo e liofilizzata. Il prodotto ottenuto viene sospeso in 20-500 ml di DMF o DMSO e addizionato con 15-300 g di un agente solfatante come l'addotto piridina.SO₃ in forma solida oppure in soluzione di DMF o DMSO. La soluzione viene mantenuta a 20-70°C, preferibilmente tra 40-60°C per 2-24 ore.

Un volume d'acqua viene aggiunto per spegnere la reazione. Quindi il pH viene neutralizzato con NaOH 1 N. Il campione viene recuperato per precipitazione con acetone saturato con NaCl. Il precipitato viene separato dal solvente tramite filtrazione. Il solido ottenuto viene solubilizzato con 100 ml di acqua deionizzata e purificato dai sali residui tramite ultrafiltrazione. Il prodotto ottenuto risulta avere un rapporto solfati/carbossili da 2 fino a un massimo di 3,2, calcolato secondo Casu et al. Carbohydrate Res. 1975, 39, 168-176. La posizione 6 dell'amminozucchero è solfatata all'80-95% e la posizione 2 è non solfatata. Gli altri gruppi solfato sono presenti nella posizione 3 dell'amminozucchero e 2 e 3 dell'acido uronico.

Un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato avente un più elevato rapporto solfati/carbossili, vale a dire di almeno 3,4, vantaggiosamente di almeno 3,5, più vantaggiosamente da 3,55 a 4, preferibilmente da 3,55 a 3,8, viene ottenuto conducendo il passaggio (a) suddetto

- (a1) trattando un detto LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato, in forma acida, con una base organica terziaria o quaternaria, lasciando la miscela di

reazione a sé per un periodo di tempo di 30-60 minuti, mantenendo il pH della soluzione a un valore di circa 7 mediante aggiunta di detta base organica terziaria o quaternaria e isolando il suo sale con detta base organica;

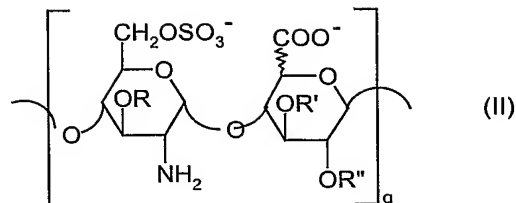
- (a2) trattando detto sale di base organica di detto LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione e isolando l'epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato.

Il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato ottenuto al termine del passaggio (a), o del passaggio (a1) + (a2), ha un grado di solfatazione da 2 a 4, e un peso molecolare medio da circa 2.500 a circa 12.500, vantaggiosamente da circa 2.500 a circa 10.500, preferibilmente da circa 2.500 a circa 8.000 e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Come si può notare, nonostante l'introduzione di 1-3 gruppi SO_3^- per ogni disaccaride, partendo da un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato a peso molecolare medio da circa 1.500 e circa 12.000, al termine del passaggio (a) si ottiene un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato con un peso molecolare medio da circa 2.500 a circa 12.500, vale a dire di poco superiore a quello del materiale di partenza. Questa diminuzione di peso molecolare è causata da una ulteriore depolimerizzazione parziale dovuta all'ambiente fortemente acido in cui il passaggio (a) viene condotto.

I LMW-epiK5-amina-O-supersolfati-depolimerizzati sono vantaggiosamente formati da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II





in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60%, preferibilmente 50-55%, da acido iduronico, R, R' e R'' rappresentano idrogeno o un gruppo SO_3^- , per un grado di solfatazione da 2 a 4, q è un numero intero da 2 a 17, vantaggiosamente da 2 a 14, preferibilmente da 2 a 11, presenta un'unità (a') come sopra definita all'estremità riducente della maggior parte delle catene e il cui catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

LMW-epiK5-amina-O-supersolfati-depolimerizzati a elevatissimo grado di solfatazione (almeno 3,4, vantaggiosamente di almeno 3,5, più vantaggiosamente da 3,55 a 4, preferibilmente da 3,55 a 3,8) ottenibili secondo i passaggi (a1) + (a2) sopra menzionati sono formati da una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula II, in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60%, preferibilmente 50-55%, da acido iduronico, R è almeno 40%, vantaggiosamente 50-80%, preferibilmente circa 65% SO_3^- , R' e R'' sono ambedue SO_3^- oppure uno è idrogeno e l'altro è 5-10% SO_3^- in acido glucuronico e 10-15% SO_3^- in acido iduronico, q è come sopra definito e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Nel passaggio (b) del procedimento della presente invenzione, la O-desolfatazione selettiva del LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato ottenuto al termine del passaggio (a) viene condotta per trattamento del LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato con una miscela dimetilsolfossido/metanolo 9/1, per esempio secondo i metodi descritti da A. Naggi et al., Carbohydrate Research, 2001,

336, 283-290, oppure in WO 01/72848 o in US 2002/0062019.

In pratica, una soluzione del LMW-epiK5-amina-O-supersolfatato ottenuto al termine del passaggio (a) viene passata attraverso una resina a scambio cationico come IR-120 H^+ lavando con acqua deionizzata e la soluzione percolata viene portata a pH tra 6 e 7 con una base organica terziaria, per esempio piridina. Il sale del LMW-epiK5-amina-O-supersolfatato-depolimerizzato con la base organica, per esempio piridina, viene isolato mediante liofilizzazione della soluzione, opportunamente concentrata. Il prodotto ottenuto viene trattato con una soluzione di dimetilsolfossido/metanolo circa 9/1 (V/V) e la soluzione ottenuta viene mantenuta a 45-90°C per un periodo variabile da 1 a 8 ore, vantaggiosamente da 2 a 4 ore, preferibilmente a 60-70°C da 135 a 155 minuti. Il prodotto parzialmente O-desolfatato, costituito da un LMW-epiK5-amina-O-solfato prevalentemente parzialmente desolfatato sugli ossidrili primari e sugli ossidrili degli acidi uronici viene isolato mediante precipitazione dalla soluzione mediante aggiunte di acqua deionizzata e, successivamente di acetone, eventualmente contenente cloruro sodico in una quantità fino a saturazione. Secondo un modo di procedere preferenziale, la miscela dimetilsolfossido/metanolo circa 9/1 (V/V) viene previamente scaldata alla temperatura desiderata, il sale del LMW-epiK5-amina-O-supersolfatato-depolimerizzato vi viene aggiunto e la durata della reazione di O-desolfatazione viene considerata a partire dal momento in cui l'insieme dei reattivi è alla temperatura scelta. Il LMW-epiK5-amina-O-solfato prevalentemente parzialmente desolfatato sugli ossidrili primari e sugli ossidrili degli acidi uronici viene isolato come sopra descritto. Un piccolo campione viene separato per la caratterizzazione, mentre il resto del prodotto viene utilizzato per il passaggio (c) di 6-O-solfatazione.

Nel passaggio (c), il precipitato da acetone viene lavato con acetone, disciolto in acqua e la soluzione viene portata a pH circa 7,5 con NaOH 2N, passata su resina IR-

120⁺, poi neutralizzata con una base organica terziaria o quaternaria come piridina o idrossido di tetrabutylammonio e il sale ottenuto viene isolato per liofilizzazione. La 6-O-solfatazione viene condotta sciogliendo il sale suddetto in dimetilformamide e aggiungendo il reattivo di solfatazione, per esempio piridina.SO₃, pure disciolto in dimetilformamide in una quantità di 2,15 g/g di prodotto sale di tetrabutylammonio. La reazione viene condotta mantenendo la miscela a circa 0°C per circa 60-120 minuti e il prodotto 6-O-solfatato viene isolato neutralizzando la soluzione con NaOH e precipitazione con acetone, eventualmente contenente cloruro sodico in una quantità fino a saturazione. L'operazione di precipitazione può essere ripetuta più volte. Il LMW-epiK5-amina-O-solfato 6-O-risolfatato così ottenuto ha un contenuto in 6-O-solfati almeno dell'80%.

Nel passaggio (d), il LMW-epiK5-amina-O-solfato 6-O-risolfatato viene trattato con un reattivo di solfatazione nelle classiche condizioni di N-solfatazione. In particolare, l'operazione viene condotta trattando una soluzione acquosa del LMW-epiK5-amina-O-solfato 6-O-risolfatato ottenuto alla fine del passaggio (c) con carbonato sodico e poi con un reattivo di solfatazione come piridina.SO₃ a una temperatura di 35-45°C e il prodotto finale, costituito dal LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato avente un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9, viene isolato sotto forma di sale sodico, per esempio mediante diafiltrazione. La reazione di N-risolfatazione può essere ripetuta.

Il sale sodico del LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato avente un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 può essere trasformato in un altro sale farmaceuticamente accettabile, come quello di un altro sale alcalino, di un sale alcalino-terroso, di alluminio o di zinco secondo metodi noti, per esempio mediante scambio ionico con opportuna resina, mediante precipitazione con solventi oppure mediante ultrafiltrazione

attraverso membrane. Sali vantaggiosi sono quelli di sodio, potassio, magnesio, calcio, alluminio e zinco. I sali preferiti sono quelli di sodio e di calcio.

Secondo un suo aspetto preferenziale, la presente invenzione fornisce un procedimento per la preparazione di LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati avente un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9, e dei loro sali farmaceuticamente accettabili, caratterizzato dal fatto che:

- (ii) si sottopone un K5-N-solfato a una depolimerizzazione nitrosa per ottenere un LMW-K5-N-solfato avente un peso molecolare medio superiore a 4.000, vantaggiosamente da circa 5.000 a circa 7.500, preferibilmente da circa 6.000 a circa 7.500;
- (i) si sottopone il LMW-K5-N-solfato così ottenuto ad un C5-epimerizzazione con D-glucuronil-C5-epimerasi per ottenere un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato contenente 40-60% di unità iduroniche;
 - (a) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato;
 - (b) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato così ottenuto ad una O-desolfatazione selettiva per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato;
 - (c) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di O-solfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato;
 - (d) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente



almeno 80% di 6-O-solfato così ottenuto ad una reazione di N-solfatazione e si isola il LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato così ottenuto sotto forma del suo sale sodico che viene eventualmente convertito in un altro sale farmaceuticamente accettabile.

Secondo questo procedimento preferenziale si ottengono LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e un peso molecolare medio di almeno circa 6.000, in particolare da circa 6.000 a circa 12.000, vantaggiosamente da circa 6.000 a circa 11.000.

I LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e i loro sali farmaceuticamente accettabili, ottenibili mediante questo procedimento preferenziale, costituiscono un altro aspetto della presente invenzione. I sali preferiti sono quelli sopra indicati, in particolare il sale di sodio o di calcio.

Secondo un altro aspetto preferenziale, la presente invenzione fornisce un procedimento che, a partire da un K5-N-solfato, attraverso la sequenza (i)→(ii), permette la preparazione di LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati e i loro sali farmaceuticamente accettabili, aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e tutta una gamma di pesi molecolari da circa 1.000 a circa 12.000.

Questo procedimento, che è particolarmente adatto alla preparazione di LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati a peso molecolare medio molto basso (da circa 2.000 a circa 5.000) che non sono ottenibili con il procedimento in cui viene utilizzata la sequenza (ii)-(i), è caratterizzato dal fatto che

- (i) si sottopone un K5-N-solfato a una C5-epimerizzazione con una D-glucuronil C5-epimerasi isolata, purificata e in soluzione o immobilizzata su un supporto solido, a un pH di circa 7, a una temperatura di circa 30°C e per un periodo di tempo di 12-24 ore in presenza di almeno uno ione bivalente

- scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese;
- (ii) si sottopone l'epiK5-N-solfato così ottenuto a una depolimerizzazione nitrosa eventualmente seguita da una riduzione, normalmente con boroidruro di sodio;
- (a) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato;
- (b) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato così ottenuto ad una O-desolfatazione selettiva per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato;
- (c) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di O-solfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato;
- (d) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato così ottenuto ad una reazione di N-solfatazione e si isola il LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato così ottenuto sotto forma del suo sale sodico che viene eventualmente convertito in un altro sale farmaceuticamente accettabile.

I LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e i loro sali farmaceuticamente accettabili, ottenibili mediante quest'altro procedimento preferenziale, costituiscono un altro aspetto della presente invenzione. I sali preferiti sono quelli sopra indicati, in particolare il sale di sodio o di calcio.

In particolare, secondo un altro dei suoi aspetti la presente invenzione si riferisce

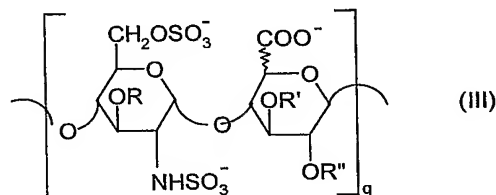
a nuovi LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e ai loro sali farmaceuticamente accettabili, ottenibili mediante quest'altro procedimento preferenziale in cui, al termine della depolimerizzazione del passaggio (ii), si ottengono LMW-epiK5-N-solfati aventi un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000, ma in particolare inferiore a 5.000, preferibilmente inferiore a 4.000, vantaggiosamente da circa 1.500 a circa 5.000, preferibilmente da circa 1.500 a circa 4.000.

E' da notare che il peso molecolare medio dei nuovi LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati è circa uguale ai pesi molecolari medi dei LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzati di partenza a causa della parziale depolimerizzazione che si è verificata nel passaggio (a) o (a1) + (a2) di O-supersolfatazione.

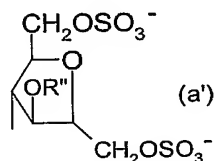
Più particolarmente, la presente invenzione concerne, secondo un suo aspetto preferenziale, nuovi LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati aventi un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9, vantaggiosamente da 2,5 a 2,9, preferibilmente da 2,7 a 2,9 e un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000, vantaggiosamente da circa 1.500 a circa 10.000, preferibilmente da circa 1.500 a circa 8.000 e caratterizzati dalla presenza della struttura (a') all'estremità riducente della maggior parte delle sue catene e i loro sali chimicamente o farmaceuticamente accettabili. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato avente un'interessante attività antitrombotica, paragonabile a quella della LMWH ma con un rischio di provocare emorragie da 2,5 a 4 volte inferiore a quello della LMWH, ha un peso molecolare di circa 6.000. Questo LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato ha preferibilmente un grado di solfatazione da 2,7 a 2,9, ha un contenuto dell'80-95% in glucosamina-6-O-solfato, del 95-100% in glucosamina N-solfato, del 45-55% in glucosamina 3-O-solfato, del 35-45% in acido glucuronico 3-O-solfato e del 15-25% in acido iduronico-2-O-solfato e presenta un'unità (a')

all'estremità riducente della maggior parte delle sue catene.

Vantaggiosi LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati della presente invenzione sono costituiti da miscele di catene di cui almeno l'80% di dette catene ha la formula III



in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, q è un numero intero da 2 a 17, vantaggiosamente da 2 a 14, preferibilmente da 2 a 11, R, R' e R'' sono idrogeno o SO₃⁻ per un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e l'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene presenta un'unità 2,5-anidromannitolo solfatata di struttura (a')



in cui R'' rappresenta idrogeno o SO₃⁻ e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

Un preferito LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato è costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula III in cui q è 8 o 9, R è 45-55% SO₃⁻, R' è 35-45% SO₃⁻ in acido glucuronico e R'' è 15-25% SO₃⁻ in acido iduronico, per un grado di solfatazione da 2,7 a 2,9 e l'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene presenta un'unità 2,5-anidromannitolo solfatata di struttura (a') come sopra definita, e i suoi sali farmaceuticamente accettabili.



I nuovi LMW-epi-K5-N,O-solfati-depolimerizzati della presente invenzione posseggono un'attività molto interessante sui parametri della coagulazione. Infatti, essi hanno un'attività anti-Xa e un'attività anti-IIa elevate e un bassissimo rischio di indurre emorragie nei pazienti che necessitano di un trattamento eparinico per il controllo della coagulazione. Particolarmente interessanti sono LMW-epi-K5-N,O-solfati-depolimerizzati aventi un peso molecolare medio di circa 6.000, N-solfatati al 95-100%, 6-O-solfatati sulla glucosamina all'80-90%, 3-O-solfatati al 45-55% sulla glucosamina, 3-O-solfatati al 35-45% sulle unità glucuroniche, 2-O-solfatati al 15-25% sulle unità iduroniche, per un grado di solfatazione di 2,7-2,9. Uno di questi LMW-epi-K5-N,O-solfati-depolimerizzati, descritto qui di seguito nell'Esempio 1, è stato provato nei test classici dell'attività anti-Xa e anti-IIa ed è stato anche provato il suo effetto sul tempo di tromboplastina parzialmente attivata (APTT, dall'inglese Activated Partial Thromboplastin Time).

I test di attività usati per la determinazione delle attività anti-IIa e anti-Xa sono basati sull'inibizione degli enzimi di coagulazione da parte del complesso formato dall'eparina e l'antitrombina III (ATIII). L'ATIII e il fattore IIa o il fattore Xa sono aggiunti in eccesso. L'enzima coagulante (clotting enzyme) residuo reagisce con il substrato con il conseguente rilascio di paranitroanilina, misurabile spettrofotometricamente, il cui livello è inversamente proporzionale al livello di enzima coagulante nel campione. I tamponi utilizzati sono: 0,9% NaCl nella determinazione dell'attività anti-Xa e Tris 0,05M + NaCl 0,15 M e Siero Albumina Bovina (BSA) all'1% nella determinazione dell'attività anti-IIa. L'attività del LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato e dei prodotti di confronto (un'eparina non frazionata commerciale e una LMWH commerciale) sono stati valutati contro la sLMWH. Sono state determinate diluizioni indicanti un'attività di circa 0,5 U/ml per l'attività anti Xa e

di 0,05 U/ml per l'attività anti-IIa. Per i calcoli è stata considerata un'attività specifica di 160 U/ml per l'eparina non frazionata.

L'effetto del LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato dell'invenzione e dei prodotti di riferimento sull'APTT è stata misurata usando "IL Test™ APTT Lyophilized Silica Kit". La coagulazione è iniziata in plasma citrato per addizione di fosfolipidi, richiesti per formare complessi con il Fattore X attivato e la protrombina. Per stimolare la produzione di Fattore XIIa si usa un attivatore di contatto fornendo una superficie in funzione di Kininogeno ad alto peso molecolare, callicreina e Fattore XIIa. Si aggiunge calcio per far partire altre reazioni. Si misura il tempo di formazione del grumo. Nel confronto degli effetti del LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato dell'invenzione e dei prodotti di riferimento, sul tempo di coagulazione, è stata usata una dose ritenuta capace di causare una coagulazione in 100 secondi. A questo scopo è stata preparata una curva dose-risposta usando dosi capaci di dare tempi di coagulazione nell'intervallo da 50 a 230 secondi. La dose capace di dare un tempo di coagulazione è stata ottenuta sotto forma di una stima della linea di tendenza.

Dai test suddetti è risultato che le attività anti-Xa e anti-IIa del LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato dell'invenzione sono circa il 50% di quelle della LMWH. Di conseguenza, il LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato dell'invenzione, come agente antitrombotico, può essere considerato come una LMWH con attività anti-Xa e anti-IIa dello stesso ordine di grandezza. E' risultato inoltre che la potenza del LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato dell'invenzione nell'aumentare il tempo di coagulazione è debole. In confronto con l'eparina non frazionata e la LMWH, sono necessarie dosi di LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato circa 5-8 volte più elevate per indurre lo stesso effetto sull'APTT.

La presente invenzione fornisce così, per la prima volta, un prodotto ottenibile

dal polisaccaride K5 che ha le stesse caratteristiche biologiche della LMWH, ma con un minor rischio pro-emorragico. I LMW-epi-K5-N,O-solfati-depolimerizzati della presente invenzione, e i loro sali farmaceuticamente accettabili, sono quindi utili come medicinali per il controllo della coagulazione e per la prevenzione e il trattamento della trombosi e come principi attivi di composizioni farmaceutiche per le indicazioni suddette.

Così, secondo un suo aspetto ulteriore, la presente invenzione fornisce composizioni farmaceutiche comprendenti, in qualità di un loro principio attivo, una quantità farmacologicamente attiva di un LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato come sopra illustrato in particolare LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato avente un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9, un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000 e la struttura (a') in cui R'' rappresenta idrogeno o SO_3^- all'estremità riducente della maggior parte delle sue catene, o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente farmaceutico.

Nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione per la somministrazione orale, sottocutanea, endovenosa, transdermica, oftalmica o topica, i principi attivi sono preferibilmente somministrati sotto forma di unità di dosaggio, in miscela con i classici eccipienti o veicoli farmaceutici.

La posologia può variare ampiamente in funzione dell'età, del peso, e delle condizioni di salute del paziente. Questa posologia comprende la somministrazione di una dose da 1 a 1000 mg, vantaggiosamente da 10 a 750 mg, preferibilmente 250 a 500 mg da una a tre volte al giorno per via endovenosa, sottocutanea, orale, transdermica o topica. Per via parenterale (sottocutanea o endovenosa), il dosaggio preferito è da 5 a 100 mg.

Vantaggiosamente, le composizioni della presente invenzione comprendono, in

qualità di un suo principio attivo, un LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato ottenibile a partire da un K5-N-solfato secondo i passaggi (i)→(ii)→(a)-(d) o (ii)→(i)→(a)-(d) del procedimento sopra descritto, o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente farmaceutico. Più vantaggiosamente, detto principio attivo è un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato avente un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000, la struttura (a') in cui R'' rappresenta idrogeno o SO_3^- , all'estremità riducente della maggior parte delle sue catene, o un suo sale farmaceuticamente accettabile. Preferibilmente detto LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato ha un peso molecolare di circa 6.000, è N-solfatato al 95-100%, 6-O-solfatato sulla glucosamina all'80-90%, 3-O-solfatato al 45-55% sulla glucosamina, 3-O-solfatato al 35-45% sulle unità glucuroniche, O-solfatato al 15-25% sulle unità iduroniche, per un grado di solfatazione di 2,7-2,9.

Secondo un suo aspetto ulteriore, la presente invenzione fornisce un metodo per il controllo della coagulazione in un mammifero, che comprende il somministrare a detto mammifero che abbisogna di detto controllo della coagulazione una quantità efficace di un LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato come sopra illustrato. Inoltre, l'invenzione fornisce un metodo per prevenire o trattare la trombosi in un mammifero, che comprende il somministrare a detto mammifero una quantità efficace di un LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato come sopra illustrato. Per il controllo della coagulazione o per prevenire o trattare la trombosi, la quantità efficace di LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato è da 5 a 100 mg. Detta quantità efficace viene somministrata in una composizione farmaceutica tra quelle sopra illustrate. Vantaggiosamente, detto LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato ha un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000 e



presenta la struttura (a') in cui R'' rappresenta idrogeno o SO_3^- , all'estremità riducente della maggior parte delle sue catene. Preferibilmente il LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato ha un peso molecolare di circa 6.000, è N-solfatato al 95-100%, 6-O-solfatato sulla glucosamina all'80-90%, 3-O-solfatato al 45-55% sulla glucosamina, 3-O-solfatato al 35-45% sulle unità glucuroniche, O-solfatato al 15-25% sulle unità iduroniche, per un grado di solfatazione di 2,7-2,9.

Infine, come illustrato qui sopra, tutti gli (epi)K5-amina-O-supersolfati-derivati aventi un grado di solfatazione da 2 a 4 hanno attività microbica e costituiscono principi attivi di composizioni farmaceutiche per il trattamento di malattie infettive, in particolare virali. Vantaggiosamente, dette composizioni farmaceutiche comprendono, in qualità di un loro principio attivo, una quantità farmacologicamente efficace di un (epi)K5-amina-O-supersolfato avente un grado di solfatazione da 2 a 4, ottenibile trattando un sale con una base organica terziaria o quaternaria di un (epi)K5-N-solfato-derivato con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente farmaceutico.

In particolare, secondo un altro dei suoi aspetti, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica contenente, in qualità di un suo principio attivo, una quantità farmacologicamente efficace di un (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato avente un grado di solfatazione da 2 a 4, ottenibile trattando un sale con una base organica terziaria o quaternaria di un (epi)K5-N-solfato-derivato con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione, di un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente farmaceutico, detto sale di (epi)K5-N-solfato-derivato con detta base organica terziaria o quaternaria essendo stato isolato secondo metodi noti, in particolare per liofilizzazione, immediatamente dopo la sua formazione a un pH da circa 5 a circa 9.

Più precisamente, 1'(epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato utilizzato come principio attivo delle composizioni della presente invenzione è ottenibile:

- (a1') trattando un (epi)K5-N-solfato-derivato, in forma acida, con una base organica terziaria o quaternaria, e isolando il suo sale con detta base organica immediatamente dopo la sua formazione a un pH da circa 5 a circa 9;
- (a2') trattando detto sale di detta base organica di detto (epi)K5-N-solfato-derivato con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione e isolando 1'(epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato, preferibilmente sotto forma di sale sodico che può essere successivamente convertito in un altro sale.

Nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione per la somministrazione orale, sottocutanea, endovenosa, transdermica, oftalmica o topica, i principi attivi (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivati sono preferibilmente somministrati sotto forma di unità di dosaggio, in miscela con i classici eccipienti o veicoli farmaceutici. La posologia può variare ampiamente in funzione dell'età, del peso, e delle condizioni di salute del paziente. Questa posologia comprende la somministrazione di una dose di un (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato da 1 a 1000 mg, vantaggiosamente da 10 a 750 mg, preferibilmente da 250 a 500 mg da una a tre volte al giorno per via endovenosa, sottocutanea, orale, transdermica oftalmica o topica.

Le composizioni farmaceutiche comprendenti un (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato come quelli sopra illustrati sono formulate con i classici eccipienti adatti per le diverse vie di somministrazione. Sono particolarmente vantaggiose le formulazioni sotto forma di creme, pomate, unguenti, geli, schiume, balsami, ovuli vaginali, supposte, soluzioni o sospensioni adatte alla somministrazione locale.



I seguenti esempi illustrano l'invenzione.

PREPARAZIONE I

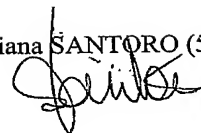
(i) *Epimerizzazione a epiK5-N-solfato*

Dieci grammi del K5-N-solfato ottenuto come descritto nell'Esempio 1, passaggi (i) e (ii), di WO 02/068477, dal cui spettro $^1\text{H-RMN}$ non appaiono segnali relativi a gruppi acetile o NH_2 , vengono disciolti in 600 ml di tampone HEPES 25 mM a pH 7, contenente CaCl_2 a una concentrazione 50 mM e la soluzione così ottenuta viene fatta ricircolare attraverso una colonna da 50 ml caricata con resina Sepharose 4B contenente $1,2 \times 10^{11}$ cpm di C5-epimerasi ricombinante (WO 96/14425) immobilizzata come descritto nell'Esempio 1 di WO 01/72848. La reazione è condotta a 30°C a pH 7 con un flusso di 200 ml/h per 24 ore. Il prodotto ottenuto viene purificato mediante ultrafiltrazione e precipitazione con etanolo. Si ottiene così un epiK5-N-solfato il cui contenuto in acido iduronico è del 54%.

(ii) *Depolimerizzazione dell'epiK5-N-solfato.*

Ad una soluzione di 1 g del prodotto così ottenuto in 25 ml di acqua distillata vengono aggiunti 230 mg di sodio nitrito disciolti in 115 ml di acqua distillata. La soluzione viene quindi portata a 4°C e il pH a 2 con HCl 0,1 N e mantenuto per 30 minuti. A fine reazione la soluzione viene portata a temperatura ambiente e il pH a 7 con NaOH 0,1 M. La soluzione viene quindi addizionata con 450 mg. di NaBH_4 e lasciata reagire per 4 ore. Il prodotto viene recuperato mediante precipitazione con 3 volumi di acetone a 4°C , filtrazione con imbuto filtrante e essiccamento a 40°C in stufa a vuoto. Si ottengono 900 mg di LMW-epiK5-N-solfato con un contenuto in acido iduronico del 54% e una distribuzione di pesi molecolari da 1.000 a 4.000, misurata con metodo HPLC.

PREPARAZIONE II



LMW-epiK5-N-solfato a peso molecolare medio di circa 5.000. Sequenza (ii)→(i)

(ii) Depolimerizzazione del K5-N-solfato

2 g di K5-N-solfato, ottenuto come descritto nell'Esempio 1, passaggi (i) e (ii), di WO 02/068477, viene depolimerizzato come descritto nella PREPARAZIONE I, utilizzando 100 mg di sodio nitrito e 300 mg di sodio boroidruro. Si ottengono 1,8 g di LMW-K5-N-solfato con un peso molecolare medio di 5.000.

(i) Epimerizzazione del LMW-K5-N-solfato

1 g di LMW-K5 N-solfato ottenuto nel passaggio (ii) qui sopra viene trattato come descritto nel passaggio (i) della PREPARAZIONE I. Si ottiene un prodotto epimerizzato con rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 44/56 contro un rapporto di 0 /100 del prodotto di partenza, con una distribuzione di pesi molecolari da 2.000 a 10.000 e con un peso molecolare medio di 5.000 D. La resa, calcolata misurando il contenuto di acidi uronici contro standard col metodo al carbazolo (Bitter and Muir, Anal. Biochem. 1971, 39, 88-92) è pari al 90%.

PREPARAZIONE III

LMW-epiK5-N-solfato. Sequenza (i)→(ii)

(i) Epimerizzazione del K5-N-solfato

Una quantità di 2 g di K5 N-solfato, ottenuto come descritto nell'Esempio 1, passaggi (i) e (ii), di WO 02/068477, viene disciolta in 120 ml di tampone HEPES 25 mM, pH 7, contenente CaCl_2 50 mM. La soluzione ottenuta viene fatta ricircolare attraverso una colonna da 50 ml caricata con la resina contenente l'enzima immobilizzato ottenuto come descritto in WO 96/14425. Questa operazione è condotta a 30°C con un flusso di 200 ml/h per 24 ore. Il prodotto ottenuto viene purificato tramite ultrafiltrazione su membrana da 1000 D e passaggio su colonna a scambio ionico IR 120 H^+ , neutralizzando l'eluato con NaOH 1N. Il campione viene recuperato per



precipitazione con etanolo o acetone. Si ottiene un prodotto epimerizzato con rapporto acido iduronico/acido glucuronico di 55/45 contro un rapporto di 0 /100 del prodotto di partenza. La percentuale di epimerizzazione è stata calcolata con $^1\text{H-RMN}$ secondo il metodo descritto in WO 96/14425. La resa, calcolata misurando il contenuto di acidi uronici contro standard col metodo al carbazolo (Bitter and Muir Anal. Biochem. 39, 88-92-1971) è pari al 90%.

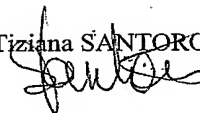
(ii) *Depolimerizzazione dell' epi-K5-N-solfato*

Un grammo di prodotto ottenuto nel passaggio (a) viene depolimerizzato mediante il metodo di degradazione con acido nitroso e seguente riduzione dell'aldeide formatasi. In particolare si procede sciogliendo il prodotto in 25 ml di acqua distillata e addizionandolo con 230 mg di sodio nitrito disciolti in 115 ml di acqua distillata. La soluzione viene quindi portata a 4°C e il pH a 2 con HCl 0,1 N e mantenuto per 30 minuti. A fine reazione la soluzione viene portata a temperatura ambiente e il pH a 7 con NaOH 0,1 M. La soluzione viene quindi addizionata con 450 mg. di NaBH_4 e lasciata reagire per 4 ore. Il prodotto viene recuperato tramite precipitazione con 3 volumi di acetone a 4°C, filtrazione con imbuto filtrante e essiccamento a 40° C in stufa a vuoto. Si ottengono 900 mg di LMW-epiK5-N-solfato con una distribuzione di pesi molecolari misurata con metodo HPLC che va da 1.000 a 4000 e con un contenuto in unità glucuroniche del 45% e di unità iduroniche del 55%.

PREPARAZIONE IV

LMW-epiK5-N-solfato a peso molecolare medio di circa 2.000

A una soluzione di 1 g di epiK5-N-solfato, ottenuto come descritto nell'esempio 12, paragrafi [0251]-[0265] di US 2002/0062019, in 200 ml di acqua distillata vengono aggiunti 480 mg di sodio nitrito disciolti in 240 ml di acqua distillata. La soluzione viene quindi portata a 4°C e il pH a 2 con HCl 0,1 N e mantenuto per 30 minuti. A fine



reazione la soluzione viene portata a pH 7 con NaOH 0,1 M e quindi a temperatura ambiente. La soluzione viene quindi addizionata con 450 mg. di NaBH_4 e lasciata reagire per 4 ore. L'eccesso di NaBH_4 viene eliminato con HCl portando il pH a 5-6. Il prodotto, neutralizzato con NaOH 0,1 M, viene recuperato tramite precipitazione con 3 volumi di acetone a 4°C , filtrazione con imbuto filtrante e essiccamento a 40°C in stufa a vuoto. Si ottengono 900 mg di LMW-epiK5-N-solfato con un peso molecolare medio di circa 2.000, costituito da una miscela di catene in cui la specie preponderante è un composto di formula I'b in cui m è 4.

PREPARAZIONE V

LMW-epiK5-N-solfato a peso molecolare medio di circa 6.000

K5-N-solfato di partenza

Una soluzione di 8 grammi di K5 puro al 95% in 800 ml di NaOH 2N viene scaldata a 60°C per 24 ore. Dopo raffreddamento, la soluzione viene portata a pH 7 con HCl 6N. Alla soluzione neutralizzata vengono aggiunti 12,8 grammi di carbonato di sodio, poi, in 4 ore e a porzioni, 12,8 grammi di addotto piridina. SO_3 in forma solida. La reazione viene mantenuta a 40°C per 24 ore. Dopo desalazione per ultrafiltrazione su membrana Millipore Prepscale TFF da 1000 D cut-off, il prodotto ottenuto viene recuperato per precipitazione con 3 volumi di acetone. Si ottengono così 8 g di K5-N-solfato il cui spettro $^1\text{H-NMR}$ mostra una N-solfatazione al 100%.

LMW-epi-K5-N-solfato. Sequenza (i) \rightarrow (ii)

(i) *Epimerizzazione.* Gli 8 grammi di K5 N-solfato così ottenuti vengono sciolti in 200 ml di tampone Hepes 0,25 M pH 7 contenente CaCl_2 50 mM e trattati in soluzione con $9,6 \times 10^{10}$ cpm di C5 epimerasi ricombinante a 30°C pH 7 per 24 ore. Alla fine della reazione il campione viene purificato dai sali per ultrafiltrazione su membrane Millipore Prepscale TFF 1000 D cut-off e quindi precipitato con 3 volumi di acetone. Si

ottengono 7,5 g di epiK5-N-solfato la cui percentuale di epimerizzazione, in pratica la quantità di unità iduroniche rispetto alle glucuroniche, calcolata con $^1\text{H-RMN}$ secondo il metodo descritto in WO 96/4425 risulta essere del 52%.

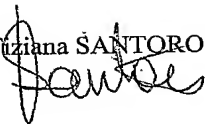
(ii) *Depolimerizzazione.* I 7,5 g di epiK5-N-solfato così ottenuti vengono sciolti in 150 ml di acqua e la soluzione viene termostata a 4°C , poi il pH è portato a 2,2 con HCl 1M precedentemente raffreddato. Alla soluzione vengono aggiunti 431,2 mg di sodio nitrito corrispondente a 21,56 ml di una soluzione al 2% di sodio nitrito in acqua. Il pH è stato riportato a 2,2 e la miscela di reazione è lasciata a 4°C per 20 minuti sotto agitazione. Dopo neutralizzazione a pH 7,0 con HCl 6N, alla soluzione vengono aggiunti 1,35 g di sodio boroidruo, la riduzione viene condotta lasciando la miscela di reazione a temperatura ambiente per 4 ore, poi l'eccesso di riducente viene eliminato portando il pH a 5 con HCl 1N, agitando fino alla scomparsa di effervescenza. Il pH viene riportato a 7-7,2 con NaOH 1M. Il prodotto depolimerizzato viene recuperato per ultrafiltrazione con membrana Millipore TFF da 1000 D cut-off e successiva precipitazione con 3 volumi di acetone. Si ottengono 7 g. Il peso molecolare medio del LMW-epiK5-N-solfato ottenuto via HPLC è 6.000 D.

ESEMPIO 1

(a) *Supersolfatazione.*

(a1) Sale di tetrabuttilammonio del LMW-epi K5-N-solfato.

Una soluzione di 7 grammi del LMW-epiK5-N-solfato ottenuto nella PREPARAZIONE V in 350 ml di acqua viene passata su una colonna di IR 120H⁺. Il pH dell'eluato è 2,91. La soluzione percolata viene portata a pH 7 con una soluzione al 15% (42,2 ml) di idrossido di tetrabuttilammonio e lasciata a temperatura ambiente per un'ora con controlli per mantenere il pH a 7. Dopo concentrazione su rotavapor del sale di tetrabuttilammonio, il campione viene congelato e liofilizzato. Si ottengono 10,9



grammi di sale di tetrabutylammonio del LMW-epiK5-N-solfato di partenza.

(a2) O-supersolfatazione.

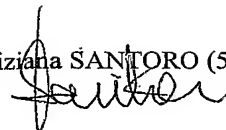
Il sale di tetrabutylammonio così ottenuto viene sciolto in 158 ml di dimetilformamide. Vengono quindi aggiunti 28,8 grammi di addotto piridina. SO_3 sciolti in 158 ml di DMF e la reazione viene mantenuta a 45°C per 18 ore. 316 ml di acqua vengono aggiunti per fermare la reazione e il pH riportato a 7 con NaOH al 30%. Il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato viene recuperato per precipitazione con 3 volumi di acetone saturo di sale (1,896 litri) e successiva diafiltrazione su membrana Millipore TFF da 1.000 D fino all'eliminazione dei sali.

(b) O-desolfatazione selettiva.

La soluzione contenente il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato ottenuto in (a) viene passata su una resina a scambio ionico IR 120H^+ a temperatura ambiente e il pH viene portato a 6,7 con piridina. La soluzione viene quindi congelata e sottoposta a liofilizzazione. Il sale di piridina (10,73 g) così ottenuto viene sciolto in una soluzione contenente 97 ml di dimetilsolfossido e 11 ml di metanolo. Il sale di piridina del LMW-epiK5-amina-O-supersolfato viene aggiunto quando il solvente è termostato a 65° . L'inizio della reazione viene considerato quando il solvente è a 65°C e, a partire da questo momento, viene mantenuta per 2 ore e mezzo. Il pH a fine della reazione è 2,24. Per raffreddare la reazione vengono utilizzati acqua e ghiaccio fino ad arrivare a circa 30°C . Vengono quindi aggiunti 4,5 ml di acqua. Il campione viene recuperato facendo percolare nella soluzione 5 volumi di acetone e il precipitato che si è forma viene recuperato per filtrazione su guch G4. La torta viene quindi lavata con acetone e poi ridisciolta in acqua. Il pH viene portato a 7,5 con NaOH 2 N. Lo spettro ^{13}C -NMR a 300 MHz è riportato in Fig.1.

(c) 6-O-Solfatazione





La soluzione viene passata su una resina IR 120 H^+ e neutralizzato con una soluzione di idrossido di tetrabutylammonio al 15%. Il sale così ottenuto viene liofilizzato. Si ottengono 12,34 g di prodotto parzialmente O-desolfatato consistente nel sale di tetrabutylammonio di un LMW-K5-amina-O-solfato. Il sale di tetrabutylammonio così ottenuto viene sciolto in 150 ml di dimetilformamide e alla soluzione vengono aggiunti 14 g di addotto piridina. SO_3 sciolti in 75 ml di dimetilformamide. La miscela di reazione viene mantenuta a $0^\circ C$ per 90 minuti, quindi vi vengono aggiunti 110 ml di acqua per fermare la reazione. Il pH di fine reazione, di 3,4, viene portato a 7,2 con NaOH 2N. Il campione viene recuperato per precipitazione con 3 volumi di acetone saturo di sale. Alcune gocce di una soluzione satura di NaCl vengono aggiunte per favorire la precipitazione. Si forma un precipitato bianco. L'operazione viene ripetuta due volte. Si ottengono 6,8 g di LMW-epiK5-amina-O-solfato con un contenuto dell'80% in glucosamina-6-O-solfato, del 50% in glucosamina-3-O-solfato, del 40% in acido glucuronico-3-O-solfato e del 20% in acido iduronico 2-O-solfato.

Lo spettro ^{13}C -NMR è riportato in Figura 2.

(d) *N-Solfatazione*

Il LMW-epiK5-amina-O-solfato ottenuto al termine del passaggio (c) viene sciolto in 500 ml di acqua e alla soluzione vengono quindi aggiunti 12,8 g di carbonato di sodio. Il pH della soluzione dopo l'aggiunta del carbonato è 10,51. Dopo aver termostato la soluzione a $40^\circ C$, vi vengono aggiunti, a porzioni e in 4 ore, 12,8 g di piridina. SO_3 solida. Il pH finale della reazione è 7,2. Il campione viene diafiltrato in presenza di NaCl e poi con acqua. Si ottengono 8,0 g di LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato a grado di solfatazione 2,83, con un contenuto del 95-100% in glucosamina-N-solfato, dell'80% in glucosamina-6-O-solfato, del 50% in glucosamina-3-O-solfato, del 40% in acido glucuronico-3-O-solfato e del 20% in acido iduronico 2-

O-solfato.

Lo spettro ^{13}C -NMR del LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato così ottenuto è riportato in Figura 3. Nella zona tra 80 e 90 ppm sono presenti i segnali attribuibili ai carboni 2,3 e 4 tipici dell'anidromannitolo (Casu B., Nouv.Rev.Fr.Hematol 1984 vol 26 p.211-19). Lo spettro mostra uno spostamento dei segnali nella zona tra 80 e 90 ppm che indica la solfatazione del carbonio di detto 2,5-anidromannitolo nelle posizioni 1,3 e 6.

ESEMPIO 2

Operando come descritto nell'Esempio 1, sottoponendo il LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato a peso molecolare medio di 5.000 ottenuto nella PREPARAZIONE II a O-supersolfatazione come in (a), trattando il sale di piridina del LMW-epiK5-O-supersolfato così ottenuto con una miscela dimetilsolfossido/metanolo circa 9/1 a 70°C per 150 minuti come in (b), trattando il sale di tetrabutylammonio del prodotto parzialmente O-desolfatato così ottenuto con piridina. SO_3 a 0°C per 90 minuti come in (c) e trattando infine il prodotto 6-O-risolfatato prima con carbonato sodico e poi con piridina. SO_3 come in (d), si ottiene un LMW-epiK5-N,O-solfato avente un peso molecolare medio di 5.000, un grado di solfatazione di 2,8, un contenuto del 95-100% di glucosamina N-solfato, dell'85% di glucosamina 6-O-solfato, del 48% di glucosamina 3-O-solfato, del 38% di acido glucuronico 3-O-solfato e del 20% di acido iduronico 2-O-solfato.

RIVENDICAZIONI

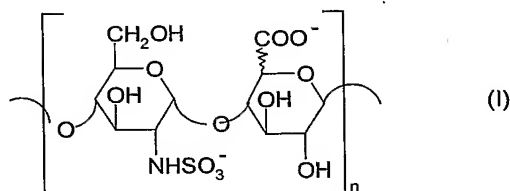
1. Procedimento per la preparazione di un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato contenente 40-60% di unità iduroniche e avente un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9, caratterizzato dal fatto che
 - (a) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria di un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato contenente 40-60% di unità iduroniche con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato;
 - (b) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato così ottenuto ad una O-desolfatazione selettiva per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato;
 - (c) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di O-solfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato;
 - (d) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato così ottenuto ad una reazione di N-solfatazione e si isola il LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato così ottenuto.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato così ottenuto è isolato sotto forma del suo sale sodico che viene eventualmente convertito in un altro sale farmaceuticamente accettabile.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detto

sale sodico è quello di un altro metallo alcalino, di un metallo alcalino terroso, di alluminio o di zinco.

4. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3, caratterizzato dal fatto che i LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza sono ottenuti con un procedimento caratterizzato dal fatto che si sottopone un K5-N-solfato, in un qualsiasi ordine,
 - (i) a una C5-epimerizzazione con una D-glucuronil C5-epimerasi isolata, purificata e in soluzione o immobilizzata su un supporto solido, a un pH di circa 7, a una temperatura di circa 30°C e per un periodo di tempo di 12-24 ore in presenza di almeno uno ione bivalente scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese; e
 - (ii) a una depolimerizzazione nitrosa seguita da una riduzione, normalmente con boroidruro di sodio.
5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che i LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza sono ottenuti secondo la sequenza (i)-(ii) e hanno un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000.
6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detto peso molecolare medio è da circa 1.500 a circa 7.500.
7. Procedimento secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che i LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza sono ottenuti secondo la sequenza (ii)-(i) e hanno un peso molecolare medio da circa 4.000 a circa 12.000.
8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detto peso molecolare medio è da circa 5.000 a circa 7.500.
9. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 1 a 8, caratterizzato dal fatto che i LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza sono costituiti da

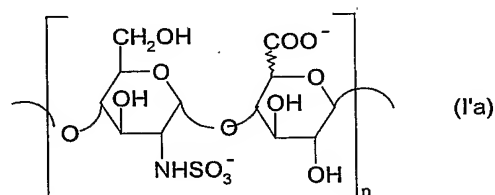


una miscela di catene in cui almeno il 90% di dette catene ha la formula I



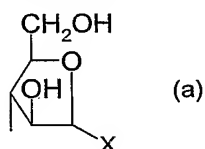
in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 2 a 20, e il corrispondente catione è chimicamente accettabile.

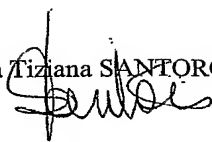
10. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 1 a 9, caratterizzato dal fatto che i LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza sono costituiti da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula I'a



in cui le unità uroniche sono costituite per il 40% a 60% da acido iduronico e p è un numero intero da 4 a 8.

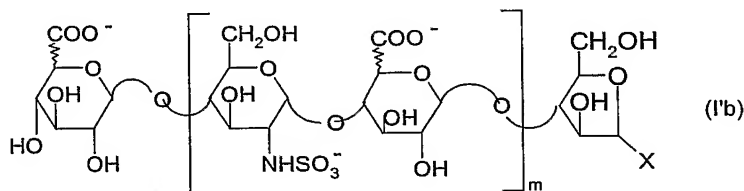
11. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 9 e 10, caratterizzato dal fatto che, all'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene, i LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza presentano un'unità di 2,5-anidromannitolo di struttura (a)





in cui X rappresenta un gruppo idrossimetile.

12. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 9 a 11, caratterizzato dal fatto che i LMW-epiK5-N-solfati-depolimerizzati di partenza sono costituiti da una miscela di catene in cui la specie preponderante ha la formula I'b



in cui X è idrossimetile, m è 4, 5 o 6, il corrispondente catione è uno ione chimicamente o farmaceuticamente accettabile e le unità glucuroniche e iduroniche sono presenti in modo alternato, l'estremità non riducente essendo glucuronica o iduronica, con un rapporto glucuronico/iduronico da 45/55 a 55/45.

13. Procedimento per la preparazione di LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati avente un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9, e dei loro sali farmaceuticamente accettabili, caratterizzato dal fatto che:
- (ii) si sottopone un K5-N-solfato a una depolimerizzazione nitrosa per ottenere un LMW-K5-N-solfato avente un peso molecolare medio superiore a 4.000;
 - (i) si sottopone il LMW-K5-N-solfato così ottenuto ad un C5-epimerizzazione con D-glucuronil-C5-epimerasi per ottenere un LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato contenente 40-60% di unità iduroniche;
 - (a) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione per ottenere

- un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato;
- (b) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato così ottenuto ad una O-desolfatazione selettiva per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato;
 - (c) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di O-solfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato;
 - (d) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato così ottenuto ad una reazione di N-solfatazione e si isola il LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato così ottenuto sotto forma del suo sale sodico che viene eventualmente convertito in un altro sale farmaceuticamente accettabile.
14. Procedimento secondo la rivendicazione 13, caratterizzato dal fatto che, alla fine del passaggio (ii) si ottiene un LMW-K5-N-solfato avente un peso molecolare medio da circa 5.000 a circa 7.500.
15. Procedimento secondo la rivendicazione 13, caratterizzato dal fatto che, alla fine del passaggio (ii) si ottiene un LMW-K5-N-solfato avente un peso molecolare medio da circa 6.000 a circa 7.500.
16. Procedimento per la preparazione di LMW-epiK5-N,O-solfati-depolimerizzati, caratterizzato dal fatto che
- (i) si sottopone un K5-N-solfato a una C5-epimerizzazione con una D-glucuronil C5-epimerasi isolata, purificata e in soluzione o immobilizzata su un supporto solido, a un pH di circa 7, a una

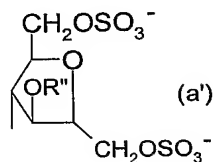
temperatura di circa 30°C e per un periodo di tempo di 12-24 ore in presenza di almeno uno ione bivalente scelto tra calcio, magnesio, bario e manganese;

- (ii) si sottopone l'epiK5-N-solfato così ottenuto a una depolimerizzazione nitrosa eventualmente seguita da una riduzione, normalmente con boroidruro di sodio;
 - (a) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-N-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato;
 - (b) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-supersolfato-depolimerizzato così ottenuto ad una O-desolfatazione selettiva per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato;
 - (c) si tratta il sale con una base organica terziaria o quaternaria del LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato così ottenuto con un reattivo di O-solfatazione per ottenere un LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato;
 - (d) si sottopone il LMW-epiK5-amina-O-solfato-depolimerizzato contenente almeno 80% di 6-O-solfato così ottenuto ad una reazione di N-solfatazione e si isola il LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato così ottenuto sotto forma del suo sale sodico che viene eventualmente convertito in un altro sale farmaceuticamente accettabile.

17. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato ottenibile secondo una della rivendicazioni da 1 a 16.

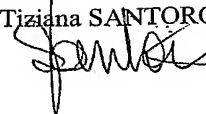


18. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato avente un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 12.000, la struttura (a')

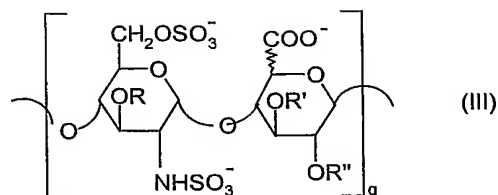


in cui R'' rappresenta idrogeno o SO₃⁻, all'estremità riducente della maggior parte delle sue catene, o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

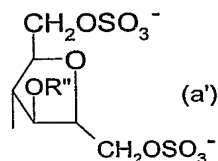
19. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo la rivendicazione 18, avente un peso molecolare medio da circa 1.500 a circa 8.000 e un grado di solfatazione da 2,5 a 2,9.
20. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo la rivendicazione 19, con un grado di solfatazione da 2,7 a 2,9.
21. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo la rivendicazione 20, avente un peso molecolare medio di circa 6.000.
22. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo una delle rivendicazioni da 18 a 21, avente un peso molecolare medio di circa 6.000, un grado di solfatazione da 2,7 a 2,9, un contenuto di glucosamina-6-O-solfato dell'80-95%, di glucosamina N-solfato del 95-100%, di glucosamina 3-O-solfato del 45-55%, di acido glucuronico 3-O-solfato del 35-45% e di acido iduronico-2-O-solfato del 15-25% e avente un'unità (a') all'estremità riducente della maggior parte delle sue catene, o un suo sale farmaceuticamente accettabile.
23. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo la rivendicazione 18 costituito da una miscela di catene di cui almeno l'80% di dette catene ha la



formula III



in cui le unità uroniche sono costituite per il 40-60% da acido iduronico, n è un numero intero da 2 a 17, R, R' e R'' sono idrogeno o SO₃⁻ per un grado di solfatazione da 2,3 a 2,9 e l'estremità riducente della maggior parte delle catene in detta miscela di catene presenta un'unità 2,5-anidromannitolo solfatata di struttura (a')



in cui R'' rappresenta idrogeno o SO₃⁻ e il corrispondente catione è chimicamente o farmaceuticamente accettabile.

24. LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo la rivendicazione 23, costituito da una miscela di catene di cui almeno l'80% di dette catene ha la formula III in cui q è un numero intero da 2 a 14.
25. LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo la rivendicazione 23, costituito da una miscela di catene di cui almeno l'80% di dette catene ha la formula III in cui q è un numero intero da 2 a 11.
26. Un LMW-epiK5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo la rivendicazione 23, costituito da una miscela in cui la specie preponderante è un composto di formula III in cui q è 8 o 9, R è 45-55% SO₃⁻, R' è 35-45% SO₃⁻ in acido

glucuronico, R'' 15-25% SO₃⁻, in acido iduronico, per un grado di solfatazione da 2,7 a 2,9.

27. Composizione farmaceutica comprendente, in qualità di un suo principio attivo, una quantità farmacologicamente attiva di un LMW-epi-K5-N,O-solfato-depolimerizzato secondo una delle rivendicazioni da 17 a 26, o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, in miscela con un eccipiente farmaceutico.
28. Composizione farmaceutica contenente, in qualità di un suo principio attivo, una quantità farmacologicamente efficace di un (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato avente un grado di solfatazione da 2 a 4, in miscela con un eccipiente farmaceutico.
29. Composizione della rivendicazione 28 in cui detto (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato è ottenibile trattando un sale con una base organica terziaria o quaternaria di un (epi)K5-N-solfato-derivato con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione.
30. Composizione secondo la rivendicazione 28, in cui detto (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato è ottenibile trattando un sale con una base organica terziaria o quaternaria di un (epi)K5-N-solfato-derivato con un reattivo di solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione, detto sale di (epi)K5-N-solfato-derivato con detta base organica terziaria o quaternaria essendo stato isolato immediatamente dopo la sua formazione a un pH da circa 5 a circa 9.
31. Composizione secondo la rivendicazione 28, in cui detto (epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato è ottenibile
 - (al') trattando un (epi)K5-N-solfato-derivato, in forma acida, con una base organica terziaria o quaternaria, e isolando il suo sale con detta base

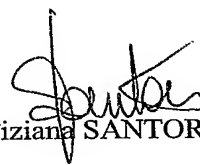
Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)



organica immediatamente dopo la sua formazione a un pH da circa 5 a circa 9;

- (a2') trattando detto sale di detta base organica di detto (epi)K5-N-solfato-derivato con un reattivo di O-solfatazione nelle condizioni di O-supersolfatazione e isolando l'(epi)K5-amina-O-supersolfato-derivato, preferibilmente sotto forma di sale sodico che può essere successivamente convertito in un altro sale.

Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)



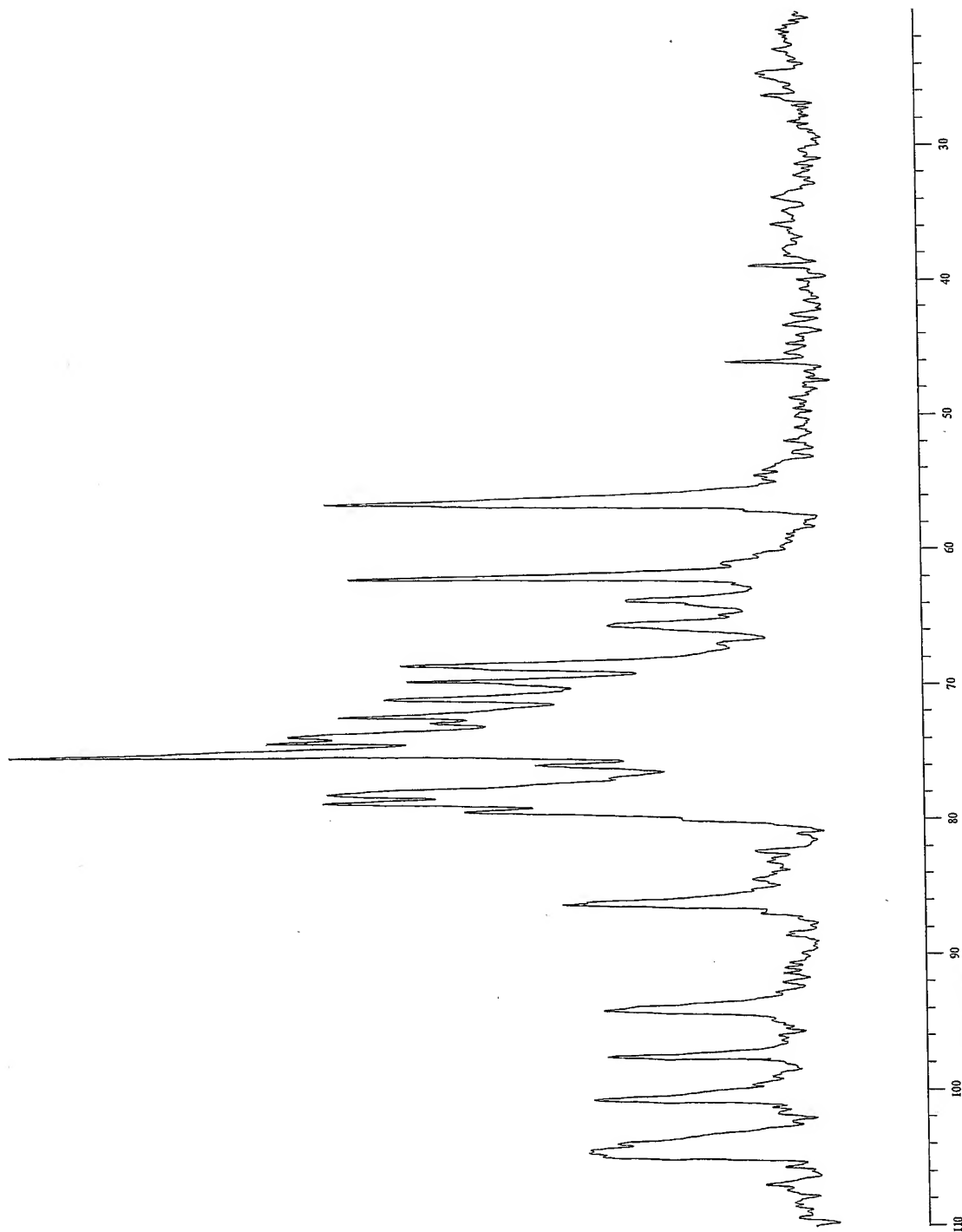
Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

Figura 1

O-desolfato parziale



MI 2003 A 0 0 2 4 9 8



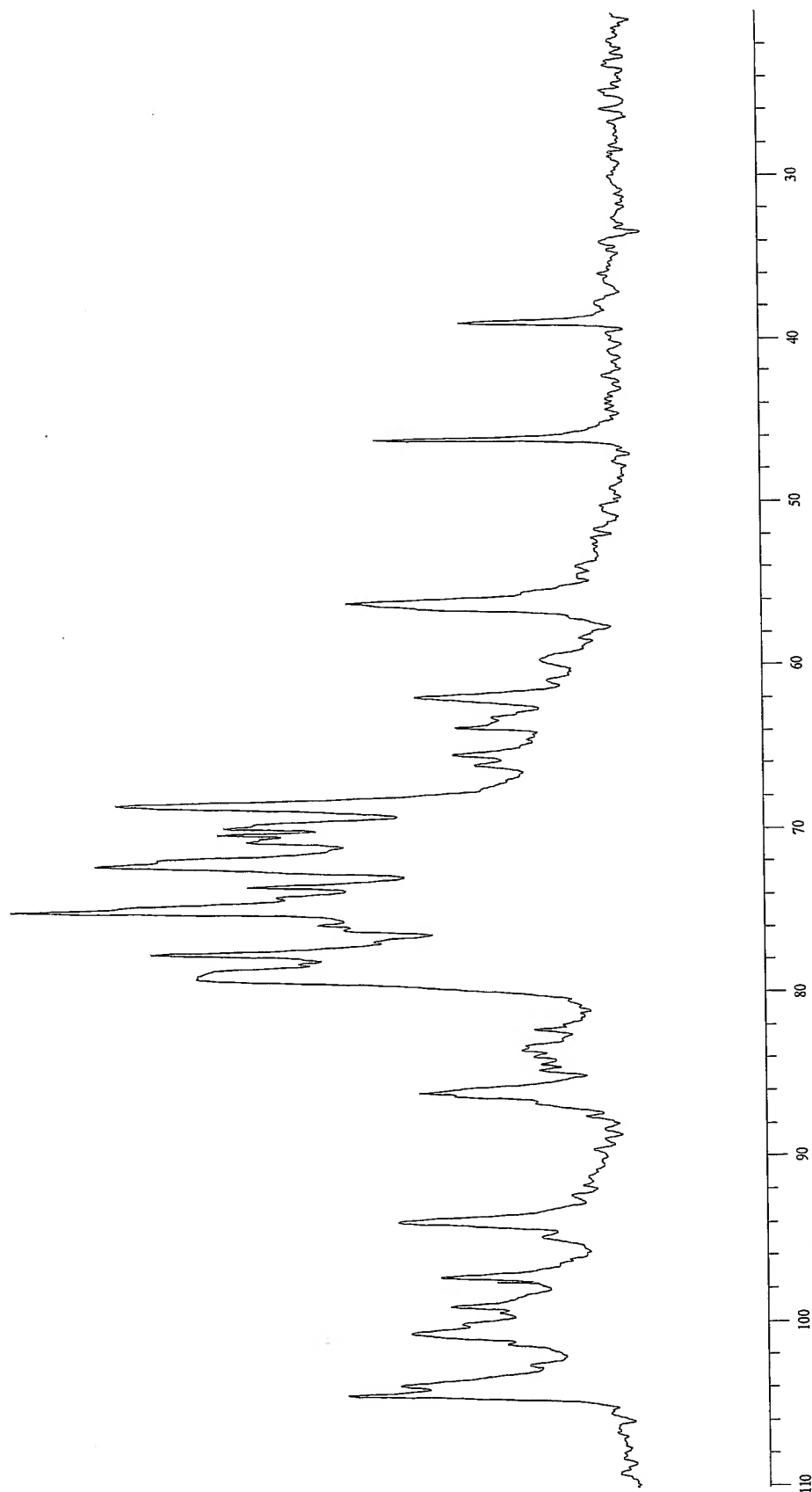
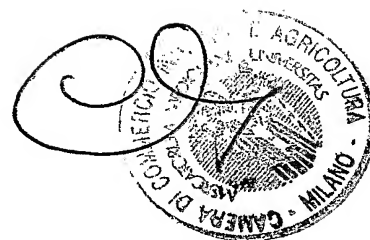


Figura 2

MI 2003 A 0 0 2 4 9 8

6-O risolfatata



Santoro
Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

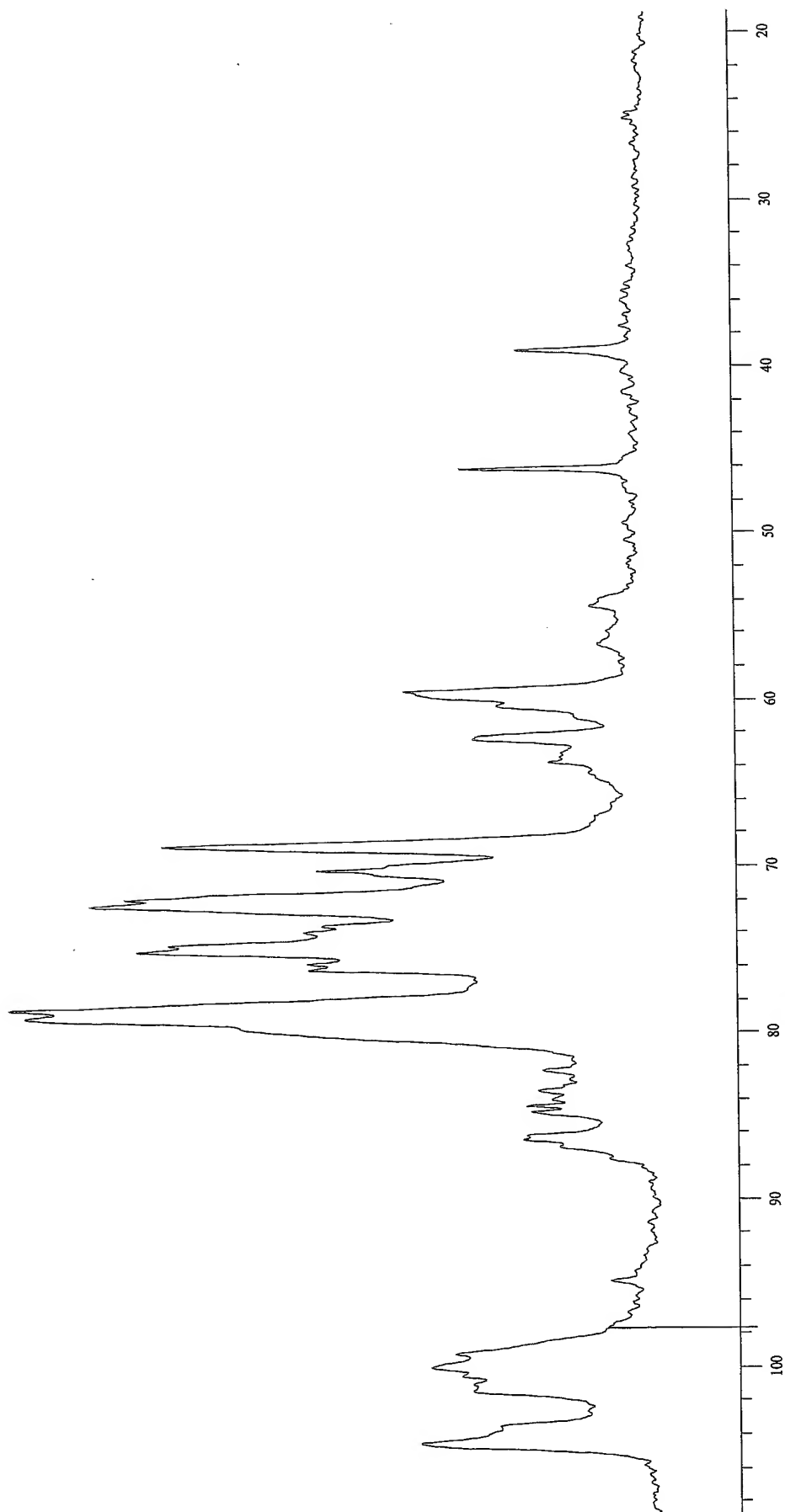


Figura 3

MI 2003 A 0 0 2 4 9 8



Prodotto finale

Santoro
Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)